

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**CONTROL DE CONTAMINANTES MICROBIANOS EN EL
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* POR SEGMENTOS NODALES
DE *Vaccinium Corymbosum* (ARÁNDANO).**

Tesis presentada por la Bachiller:

Gutiérrez Carazas, Mayhumi Dalia.

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga.

Asesor: Mg. Bardales Álvarez,
Roxana Margarita.

Arequipa- Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20190000009877

N° Trámite en Fac. 426-2019

Fecha Recep. Fac. 19-03-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: GUTIERREZ CARAZAS, Mayhumi Dalia



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"CONTROL MICROBIANO CON ANTIBIOTICOS Y TIEMPOS DE INMERSION CON NACIO EN EL CULTIVO *in vitro* DE SEGMENTOS NODALES DEL *Vaccinium corymbosum* (ARANDANO) PARA SU MICROPROPAGACION"

DICTAMINADORES: Ing. Cinthia Córdoba Barrios 2) Mgter. Joshelyn Paredes Zavala

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "ESTABLECIMIENTO *in vitro* POR SEGMENTOS NODALES EN EL CONTROL DE CONTAMINANTES MICROBIANOS DE *Vaccinium corymbosum* (ARANDANO)", después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:  


FECHA 25/04/2019

ASESOR: Mgter. Roxana Bardales Álvarez

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "CONTROL DE CONTAMINANTES MICROBIANOS EN EL ESTABLECIMIENTO *in vitro* POR SEGMENTOS NODALES DE *Vaccinium corymbosum* (ARANDANO)", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA 

FECHA 5/08/2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Mgter. Cinthia Córdoba Barrios
- 2) Mgter. José Carpio Carpio
- 3) Mgter. Joshelyn Paredes Zavala

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrentes, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA   

FECHA 14/12/2020

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

FECHA

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mi Dios todo poderoso por siempre protegerme y guiarme en el camino. En especial a mi familia, mi querida mami Dalia Carazas Wong y mis lindos hermanitos Gabriela, Nian y Claudio Gutiérrez Carazas que siempre me apoyaron incondicionalmente, gracias a todos ellos termine este gran paso en mi vida y a todas las personas que me ayudaron, colaboraron e inspiraron en la desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios todo poderoso y a toda mi familia que siempre me apoyaron a terminar este gran paso en mi vida, así como a todos los docentes que me ayudaron con mis consultas colaborando con sus conocimientos, a mi asesora Mg.

Bardales Álvarez, Roxana Margarita, al Ing.

Saravia Navarro David como a todos los profesores de la Universidad Agraria de la Molina y para Alexandra Elbakyan que brinda tener acceso a todos a la información científica actual de manera gratuita. Gracias a todos por su colaboración durante todo el proceso en la elaboración de mi tesis.

ÍNDICE

Listado de Figuras

Listado de Tablas

Listado de Anexos

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

ANTECEDENTES

CAPITULO I..... 1

MARCO TEÓRICO..... 1

1. GENERALIDADES DEL ARÁNDANO: 1

1.1 Descripción Botánica: 1

1.2 Exigencias del Clima y Suelo..... 2

1.3 Variedades de Arándanos..... 3

1.4 Enfermedades en Campo..... 4

2. CULTIVO *IN VITRO*: 4

2.1 Etapas de la micropropagación: 5

2.2 Problemas frecuentes en la micropropagación 6

2.3 Control preventivo de la contaminación microbiana 8

2.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico-desinfección: 8

3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA 9

3.1 Aislamiento:..... 9

3.2 Métodos fenotípicos de identificación bacteriana..... 10

3.2.1 Características Microscópicas:..... 10

3.2.2 Características Macroscópicas: 11

3.3 Identificación Bacteriana 12

3.3.1 Taxonomía bacteriana..... 12

4. ANTIBIOGRAMA - Prueba de sensibilidad 14

4.1 Parámetros a Estandarizar..... 14

4.2 Método de difusión en disco (Disco-placa):	14
4.3 Discos de sensibilidad.....	15
4.3.1 Antimicrobianos recomendados:.....	15
4.4 Lectura e Interpretación de los Resultados	16
CAPÍTULO II	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
5. MATERIALES.....	17
6. MÉTODOS.....	19
6.1 Tipo de Investigación:	19
6.2 Lugar de Ejecución:	19
6.3 Material Vegetal:	19
6.4 PROCEDIMIENTO:.....	20
6.4.1 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DE DESINFECCIÓN:	21
6.4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:	24
6.4.3 ANTIBIOGRAMA: Prueba de sensibilidad antimicrobiana.	27
CAPÍTULO III.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN:.....	30
7.1 Análisis del efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %:.....	30
7.2 Análisis del efecto combinado del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % con dos antibióticos:	34
8. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANO:	43
8.1 Aislamiento:.....	43
8.2 Identificación del género microbiano:	45
9. ANTIBIOGRAMA: Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana.	50
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	55
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	56
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plantas madre de arándano variedad Biloxi.	20
Figura 2: Explantes (segmentos nodales) de arándano (<i>Vaccinium Corymbosum</i>).	21
Figura 3: Segmentos nodales con contaminación bacteriana en la superficie del medio de cultivo in vitro.	25
Figura 4: Antibiograma: siembra de los discos de sensibilidad.	28
Figura 5: Porcentajes de Hipoclorito de sodio al 3 % en la desinfección de segmentos nodales de <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	32
Figura 6: Porcentajes de inmersión en Hipoclorito de sodio (3%) con antibióticos en la desinfección de segmentos nodales de <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	36
Figura 7: Porcentajes de contaminación microbiana en la desinfección por segmentos nodales del <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	39
Figura 8: Porcentajes de oxidación y viabilidad en la desinfección por segmentos nodales del <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	40
Figura 9: (A) contaminación bacteriana y (B) contaminación fúngica, crecimiento sobre el medio de cultivo (WPM) o alrededor de la base de los explantes de <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	41
Figura 10: Oxidación de explantes (A) con Hipoclorito de sodio al 3% y (B) Hipoclorito de sodio al 3% más el antibiótico.	42
Figura 11: Explantes viables en la evaluación con Hipoclorito de sodio al 3 %.....	42
Figura 12: Explantes viables en la evaluación con Hipoclorito de sodio al 3 % con antibióticos.	42
Figura 13: Segmentos nodales con presencia de contaminación bacteriana in vitro.....	43
Figura 14: Cultivo primario en medio Agar nutritivo	44
Figura 15: Aislamiento hasta la purificación de la bacteria (cultivo puro).	44
Figura 16: A. tinción de Gran, B. tinción Ziehl Neelsen y C. tinción de Wirtz-Conklin (Schaeffer-Fulton).	46
Figura 17: Pruebas bioquímicas:	49
Figura 18: Antibiograma frente a la cepa bacteriana.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos evaluados en la desinfestación de segmentos nodales de <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	23
Tabla 2: Discos de sensibilidad (Antimicrobianos) usados en el Antibiograma.	29
Tabla 3: Porcentajes del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %	32
Tabla 4: Efecto combinado del tiempo de inmersión en NaClO (3 %) con dos antibióticos.	35
Tabla 5: Análisis de varianza ANOVA.	37
Tabla 6: Resultados de los tratamientos de desinfección por segmentos nodales de <i>Vaccinium Corymbosum</i> (arándano).	38
Tabla 7: Características del cultivo puro.	45
Tabla 8: Tabla resumen de la interpretación de los resultados en la identificación del género microbiano.	49
Tabla 9: Interpretación de la prueba de sensibilidad Antimicrobiana.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Plantas madre de Arándano de la variedad biloxi.....	62
Anexo B: Solución desinfectante.	63
Anexo C: Siembra del material vegetal en el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM).....	63
Anexo D: Preparación de medios de cultivo diferenciales y/o enriquecidos.	63
Anexo E: Reactivos empleados en la identificación bacteriana.	64
Anexo F: Suspensión bacteriana equivalentes al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland. .	64
Anexo G: Discos de sensibilidad comercial de las marcas Biodisc Sac, Oxoid-UK y BBL.	64
Anexo H : Composición química del Medio Woody Plant (WPM).....	65
Anexo I: Gráfico de medias de las variables de contaminación bacteriana, contaminación fúngica, oxidación y de viabilidad de explantes.....	66
Anexo J: Resultados de las pruebas bioquímicas del contaminante bacteriano del establecimiento in vitro de <i>Vaccinium Corymbosum</i> L. (arándano).....	67
Anexo K: Medición de los halos de inhibición en la prueba de sensibilidad.....	68

RESUMEN

En el establecimiento del cultivo *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) presenta un alto porcentaje de contaminación microbiana, siendo un gran problema recurrente en su cultivo, ya que hasta el momento los métodos de desinfección son insatisfactorios para mantener cultivos libres de contaminantes que ocasionan pérdidas del material vegetal, económicas y de tiempo. Con los segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) se evaluó 9 tratamientos de desinfección a los 4, 6 y 8 minutos de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3% y la aplicación de dos antibióticos Bencilpenicilina y Amoxicilina combinada con Hipoclorito de sodio al 3 %. Posterior a ello, se aisló y caracterizó el contaminante bacteriano resistente al proceso de desinfección de la fase de establecimiento mediante pruebas bioquímicas tradicionales, además se realizó un antibiograma en el estudio de su sensibilidad. Se obtuvo el mayor porcentaje de explantes asépticos y de viabilidad con Hipoclorito de sodio al 3 % con el tratamiento 2 (T2) a los 6 minutos de inmersión y la inmersión combina de Hipoclorito de sodio al 3 % con antibiótico fue el tratamiento 8 (T8). El contaminante aislado e identificado pertenece al género *Bacillus* y presentó sensibilidad a la Tetraciclina (30 ug), kanamicina (30 ug), Cloranfenicol (30 ug), Vancomicina (30 ug), Amikacina (30 ug). Los resultados de este trabajo de investigación contribuirán al desarrollo de estrategias de mejoramiento en la prevención, así como al desarrollo de un plan de respaldo contra los contaminantes microbianos recurrentes *in vitro*, siendo los antimicrobianos una buena alternativa de solución para el éxito del proceso.

Palabras clave: Arándano, establecimiento *in vitro*, antibióticos, aislamiento microbiano y antibiograma.

ABSTRACT

In the establishment of the *in vitro* culture by nodal segments of *Vaccinium Corymbosum* (blueberry) there is a high percentage of microbial contamination, which is a recurrent problem in its cultivation, since up to now the disinfection methods are unsatisfactory to maintain cultures free of contaminants that cause losses of plant material, economic and time losses. With the nodal segments of *Vaccinium Corymbosum* (blueberry), 9 disinfection treatments were evaluated at 4, 6 and 8 minutes of immersion in 3% sodium hypochlorite and the application of two antibiotics Benzylpenicillin and Amoxicillin combined with 3% sodium hypochlorite. Subsequently, the bacterial contaminant resistant to the disinfection process of the establishment phase was isolated and characterised by means of traditional biochemical tests, and an antibiogram was carried out to study its sensitivity. The highest percentage of aseptic explants and viability was obtained with 3% sodium hypochlorite with treatment 2 (T2) after 6 minutes of immersion and the combined immersion of 3% sodium hypochlorite with antibiotic was treatment 8 (T8). The isolated and identified contaminant belongs to the genus *Bacillus* and showed sensitivity to Tetracycline (30 ug), kanamycin (30 ug), Chloramphenicol (30 ug), Vancomycin (30 ug), Amikacin (30 ug). The results of this research work will contribute to the development of improvement strategies in prevention, as well as to the development of a backup plan against recurrent microbial contaminants *in vitro*, with antimicrobials being a good alternative solution for the success of the process.

Keywords: Blueberry, *in vitro* establishment, antibiotics, microbial isolation and antibiogram.

INTRODUCCIÓN

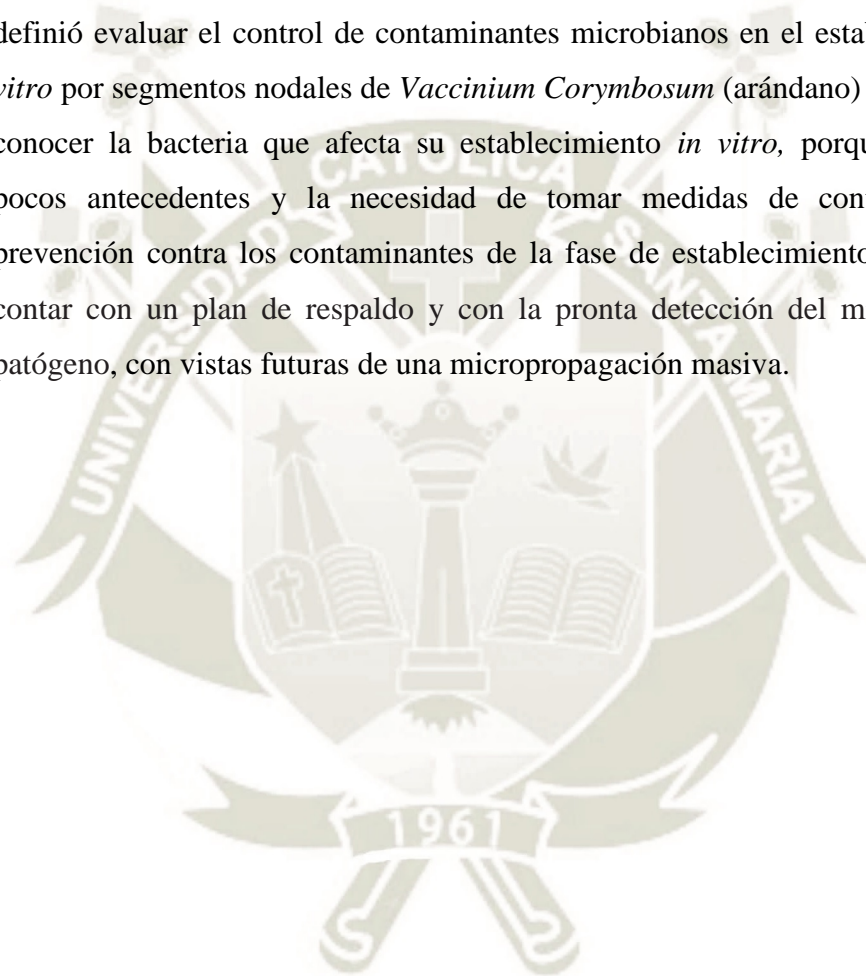
La micropropagación una alternativa para producir una gran cantidad de material vegetal en un corto tiempo garantizando la sanidad y calidad (1), que permite lograr plantas con características genéticas similares a la que le dio origen. Una de sus etapas es el establecimiento *in vitro*, siendo esta etapa considerada como el mayor limitante del desarrollo de un protocolo de micropropagación por la repetida frecuencia de contaminantes, ya sean fúngicos o bacteriológicos que colonizan los explantes y el medio de cultivo ocasionando su oxidación o al final su muerte prematura. Siendo uno de los problemas más serios y frecuentes durante todo el proceso de la micropropagación *in vitro*. (1) (2)

En la etapa de establecimiento *in vitro* existen métodos detallados de desinfección o de descontaminación inicial del material vegetal de partida, sin embargo, hasta ahora no siempre se logra la total descontaminación, ya sea por la insuficiencia de protocolos efectivos para la manipulación del tejido o por la presencia de microorganismos resistentes a los métodos empleados en la desinfección (3). Entre los contaminantes *in vitro*, las bacterias han sido consideradas como las que causan los daños más serios, algunas especies tienen la capacidad de manifestar crecimiento en los medios de cultivo inmediatamente, pero otras permanecen latentes por largos períodos de tiempo en el interior de las células (3), teniendo una competencia por los nutrientes del medio de cultivo causando daños directos e indirectos por la colonización del tejido y la expulsión al medio de metabolitos tóxicos. (4) (3)

El arándano por ser una especie de amplia distribución comercial y de interés económico en el mundo por sus cualidades nutricionales como medicinales de sus frutos. Su micropropagación *in vitro* atrae gran interés agroindustrial y comercial, se han explorado numerosos métodos de desinfección en la propagación de ella, siendo la fase de establecimiento *in vitro* la más difícil y importante donde aún se reportan altos porcentajes de contaminación provocados por

microorganismos malignos que causan pérdidas del material vegetal. Es por ello sumamente importante la detección y eliminación de microorganismos desde el inicio del proceso que permitan realizar los subcultivos con un mínimo de reinfeción. (5)

Teniendo en cuenta la problemática planteada en este trabajo de investigación, se definió evaluar el control de contaminantes microbianos en el establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) como también conocer la bacteria que afecta su establecimiento *in vitro*, porque existe muy pocos antecedentes y la necesidad de tomar medidas de control como de prevención contra los contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro* para contar con un plan de respaldo y con la pronta detección del microorganismo patógeno, con vistas futuras de una micropropagación masiva.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el control de contaminantes microbianos en el establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

Objetivos Específicos

1. Analizar el efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en NaClO (3%) en la desinfestación por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).
2. Analizar el efecto combinado del tiempo de inmersión en NaClO (3%) con dos antibióticos en la desinfestación por segmentos nodales del *Vaccinium Corymbosum* (arándano).
3. Caracterizar los microorganismos bacterianos resistentes al proceso de desinfestación mediante pruebas bioquímicas y microscópicas.
4. Evaluar la sensibilidad antimicrobiana del microorganismo aislado.

JUSTIFICACIÓN

La contaminación microbiana que existe en los cultivos en campo como también en la micropropagación *in vitro*, sigue siendo uno de los inconvenientes más importantes y costosos que no permiten potenciar el cultivo masivo *in vitro* del arándano.

A pesar de la existencia de protocolos de desinfección, aún no se puede asegurar la eficacia de los procesos, ya que la presencia de microorganismos resistentes a la desinfección causa una alta tasa de contaminación microbiana que afecta el establecimiento *in vitro*, existiendo un vacío de información que ahonde en el conocimiento de estrategias de desinfección con uso de antibióticos en la disminución de contaminantes *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* (arándano). Este proyecto de investigación aportará conocimientos alternativos para solucionar el problema de la contaminación en el establecimiento *in vitro*.

La contaminación microbiana causa una elevada tasa de contaminación que ocasiona un problema a los agricultores de Arándano, ya que genera grandes pérdidas económicas. Sin la presencia de contaminación microbiana que existe en los cultivos de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), se tendría la posibilidad de tener mayores productores como producción de arándano en el país.

HIPÓTESIS

Dado que existe evidencias de microorganismos resistentes a los procesos de desinfección que no permiten ejercer un efectivo establecimiento *in vitro*, es posible controlar la contaminación microbiana mediante el uso combinado de Hipoclorito de sodio y antibióticos, así como mediante la identificación de microorganismos resistentes para la administración de antibióticos alternativos que permitan un adecuado establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).



ANTECEDENTES

Este trabajo se relaciona con investigaciones presedentes, como el trabajo de Gómez AH, Esquivel AA. (2013), en su artículo de “*Establecimiento in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.)*”, tomaron explantes provenientes de plantas adultas de arándano (variedad Avonblue) de la Universidad de Costa Rica, en Alajuela. Para el establecimiento *in vitro* usaron estacas a cuatro distintas desinfecciones, se encontró que la utilización de brotes tiernos de las plantas maduras y la desinfección con Hipoclorito de sodio al 1,5 % y 0,1 % con Tween 20 por 40 minutos, permitió el mayor porcentaje de explantes asépticos y que la adición de CPPU indujo el mayor número de brotes a partir del explante inicial. (6)

Bonilla V, Marcha AE-T. (2016), en su artículo “*Establecimiento in vitro de (Vaccinium consanguineum), un arándano nativo de Costa Rica*”. El objetivo de la investigación fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro*, utilizando miniestacas del campo, realizando varios tratamientos de desinfección con varias soluciones como Hipoclorito de sodio, calcio y cloruro de mercurio (HgCl₂), en varias concentraciones. La solución que permitió los mayores porcentajes de estacas establecidas asépticamente fue HgCl₂ al 0,2 % durante 5 minutos. (2)

Los artículos precedentes de investigación sobre el empleo de antibióticos en la multiplicación *in vitro*, como en el trabajo de Alvarado-Capó, NG-B. 2006, en su artículo “*Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de Pantoea agglomerans, contaminante de la multiplicación in vitro de Solanum tuberosum L.*”, evaluaron el efecto del Sulfato de gentamicina en el control de un contaminante bacteriano de alta frecuencia de aparición. Aislaron los microorganismos sobre los medios de cultivo en fase de multiplicación, identificándose como contaminante a *Pantoea agglomerans* y mostró sensibilidad al Sulfato de Gentamicina. (7)

Guerrero M, Basantez K, RG-K-B y etc. (2016), en su artículo. “*Establecimiento in vitro de brotes de Vasconcellea x helbornii (Badillo) Badillo*”. Su objetivo fue establecer *in vitro* de brotes de yemas axilares a partir de plantas madre de tabaco. Evaluó tres concentraciones de Hipoclorito de sodio (1, 1.5 y 2 %) a 5 y 10 minutos. Además,

determinó el efecto del uso de Gentamicina 50 mg L⁻¹ y Estreptomina 25 mg L⁻¹ en el medio de cultivo. Los mejores resultados fueron con Hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 10 minutos y la inmersión en una solución con los dos antibióticos por 3 horas. Se logró un 68.5 % de establecimiento *in vitro* de los brotes a los 21 días de cultivo. (8)

Rosa L da, Etcheverria C y etc. (2009) en su artículo “*efeito de antibiótico e do período de escuro no estabelecimento in vitro de mirtilo vacciniun spp*”. Se verificó que no hubo influencia del uso del antibiótico Oxitetraciclina y Sulfato de Estreptomina en la contaminación en el medio de cultivo. (1)

Este trabajo se relaciona con la investigación planteada sobre la incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación *in vitro*, en el trabajo de Alvarado-Capó Y, NG-B y etc. (2003), en su artículo de “*Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar*”. Determinaron la incidencia de contaminantes microbianos en las fases de Establecimiento, Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar, dando porcentajes de contaminación por grupo microbiano en 731 ápices en la fase de establecimiento. En las tres fases se constató la presencia de microorganismos contaminantes (hongos filamentosos, bacterias y levaduras) con predominio de las bacterias (13.7 – 31.6 %). (9)

En el trabajo de González N, Carabaloso I, YA-C-B y etc. (2003), en su artículo “*Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento in vitro del guayabo*”. Evaluó la incidencia y el efecto de la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* del Guayabo así como aislar e identificar los principales contaminantes. Trabajaron con un total de 34 segmentos nodales de guayabo que no lograron establecerse, 28 de ellos presentaban contaminación microbiana visible sobre el medio de cultivo y/o alrededor de la base del explante. Los resultados obtenidos indicaron que la contaminación microbiana limitó el establecimiento *in vitro* del Guayabo, se determinó que el 76.47 % presentaban contaminación bacteriana, el 5.88 % por levaduras y el 17.64 % no presentaban contaminantes detectables. Los contaminantes más frecuentes pertenecieron a las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*. (10)

Este trabajo es pertinente también con la investigación aquí planteada, ya que aborda la identificación de bacterias, el trabajo de Ramírez L, Castaño S, López R. (2009), en su

artículo “*Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de Guadua angustifolia Kunth*”. Cultivaron segmentos nodales que presentaron un alto grado de contaminación por bacterias afectando su micropropagación de la fase de establecimiento. Se identificó los géneros: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, y una asociación entre *Erwinia-Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* fue el principal agente contaminante para los segmentos nodales basales (26.8 %) y la asociación *Erwinia-Pseudomonas* para segmentos nodales medios (26.6 %). El antibiograma, donde los Géneros encontrados presentaron sensibilidad a Amikacina, Gentamicina y Vancomicina.

(4)



CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES DEL ARÁNDANO:

El arándano o blueberry es un fruto de origen silvestre que pertenece al género *Vaccinium* de la familia de las Ericáceas, es nativo del norte de los estados unidos encontrándose asimismo este grupo de especies distribuidas en América del Sur, Europa Central y algunas de ellas encontradas en África y Madagascar. (11).

Al género *Vaccinium* pertenecen 30 especies de las cuales unas cuantas de ellas son comercialmente distribuidas como las de *Vaccinium Corymbosum* L. siendo una de las más destacada con un 80 % aproximadamente del total de la superficie cultivada por su buena calidad del fruto, seguida por la variedad de *V. ashei* Reade con un 15 % aproximadamente y un 5 % las variedades restantes. (11)

El Arándano es considerado un fruto de crecimiento comercial internacional con un auge en el consumo masivo de este fruto a nivel internacional por sus cualidades nutricionales y gran porcentaje de antioxidantes, los frutos pueden ser comercializados como frutas frescas, frutos secos, extractos y usados en alimentos procesados. Las especies de mayor interés es *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano alto, highbush) y las variedades que mejor se adaptan en el Perú son Biloxi, Misty y Legacy. (12)

1.1 Descripción Botánica:

Los Arándanos son arbustos erectos o rastreros que crecen en suelos arenosos y acidófilos con materia orgánica, su altura varía de acuerdo a la variedad pudiendo alcanzar los 3 metros y sus hojas son simples de manera alternada a lo largo del tallo cuya forma va desde ovalada a lanceolada. Las flores son de color blanco a rosado, los frutos maduros

son negro-azulado pesando de 1 a 4 gramos su zumo es aromático e incoloro y cuenta con una gran longevidad pudiendo superar los 50 años en muchos casos (11)(13).

- ✓ **Hojas:** Son simples, alternas con pecíolos cortos con una longitud de 5 cm de forma elíptico-lanceoladas y ligeramente dentadas de un rango de color característico desde verde pálido a verde muy intenso(11)(14).
- ✓ **Flores:** Generalmente se encuentran en axilares o terminales con una corola acampanada blanca o rosada formada por 4-5 pétalos fusionados con 8 a 10 estambres con anteras aristadas o no.(11) (14)
- ✓ **Fruto:** de forma casi esféricas con un peso de 0,5 a 4,0 gramos, de sabor dulce y ligeramente ácido. La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas que le dan una apariencia muy atractiva de gran importancia en el momento de la comercialización. (11) (14)
- ✓ **Tallo:** La ramificación es abundante nacen de la base de la planta de color marrón anaranjado según sea la variedad, llevan las yemas vegetativas y las flores, su grosor depende de la edad de la planta y de su ubicación dentro de ella. (14)
- ✓ **Raíces:** El sistema radical de los arándanos es superficial formándose el 80% de éste en los primeros 40 cm, tienen raíces finas y fibrosas distribuyéndose superficialmente con ausencia de pelos absorbentes teniendo la necesidad constante de humedad, necesita un suelo suelto y bien aireado que permita el desarrollo de una abundante ramificación. (11) (14)

1.2 Exigencias del Clima y Suelo

Una plantación de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) tiene requerimientos y exigencias necesarias con el propósito de conseguir buenas cosechas.(15)

- ✓ **Suelo:** Los suelos para la plantación deben ser suelos sueltos y deben estar con un pH entre 4,4 - 5,5 bien drenados con 3 a 5 % de materia orgánica y que permite

mantener la retención de humedad necesaria para el óptimo desarrollo del sistema radical (11) (15). Las raíces del Arándano no son capaces de soportar suelos compactados porque está compuesta de raíces finas y fibrosas que se concentran en un 80 % a 50 cm de profundidad del suelo muy cerca de la superficie (15).

- ✓ **Clima:** Los Arándanos son de climas moderados teniendo en cuenta la variedad que fuese necesitan de tiempos de frío entre 400 y 1200 horas con un umbral de 7 °C para cumplir su receso invernal de latencia, pueden llegar a soportar temperaturas muy bajas durante el invierno hasta -30 °C . (11) (15)
- ✓ **Agua:** El Arándano es muy sensible al déficit y exceso de agua debido a sus raíces de poca extensión. Además, de un análisis microbiológico para asegurar que se regará con agua de buena calidad y limpia, los sistemas de riego localizado permiten una humedad adecuada en los primeros 15 a 20 cm del suelo donde se encuentra gran parte de las raíces. (15)

1.3 Variedades de Arándanos

El Arándano Azul (*Vaccinium corymbosum*) crece en la zona noreste de Estados Unidos comenzó su domesticación a partir de 1900 siendo una de las primeras por su calidad de fruto, gran tamaño y sabor con una coloración de fruto entre negro–azulado de ahí su importancia en ser cultivada. Es un arbusto de aspecto vertical con una altura que puede alcanzar 1.8 metros con flores de color rosa pálido. (11) (12)

Las especies de mayor interés de *Vaccinium corymbosum* L. que mejor se adaptan en el Perú son: las variedades Biloxi, Misty y Legacy (12).

Biloxi: Demanda un mínimo de 400 horas de frío al año, temprana producción frutal, fruto de mediano tamaño, color azul claro, muy firme y de excelente sabor. Florece muy temprano pudiendo ser afectada por heladas (16).

Misty: Demanda entre 150 a 300 horas de frío al año, fruto de tamaño mediano a grande, firme, buen sabor y color azul claro. La producción es temprana teniendo la posibilidad de una segunda cosecha en otoño con una menor producción (16).

Legacy: Demanda entre 500 a 600 horas de frío al año, arbusto de crecimiento vertical, ligeramente abierto y bastante vigoroso. Es catalogada por su alta producción y se adapta bien a las cosechas mecánicas (16) (11).

1.4 Enfermedades en Campo

El arándano es un fruto rico en nutrientes como en sabor y con gran crecimiento comercial internacional pero también es muy sensible a plagas (mayormente causadas por insectos) y enfermedades que modifican su desarrollo, bajan su productividad, calidad y ocasionan pérdidas económicas importantes (11) (15). Enfermedades producidas por Hongos como: Antracnosis del fruto: *Colletotrichum acutatum*, *Monilia* (*Monilia* sp.), Muerte regresiva: *Phomopsis* (*Phomopsis vaccinii*), *Alternaria* (*Alternaria* sp.) (11) (16) y enfermedades producidas por Bacterias como: Agallas del Cuello: *Bacteriosis* (*Agrobacterium tumefaciens*) y tizon bacteriano (*Pseudomonas syringae*), siendo enfermedades más importantes que atacan los cultivos de arándano en campo abierto. (11) (15) (16)

2. CULTIVO *IN VITRO*:

La micropropagación es la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado bajo condiciones rígidas de esterilidad, temperatura y fotoperiodos de luz en un medio de cultivo nutritivo para un desarrollo adecuado a gran escala (17) (18). Siendo un instrumento muy importante en los programas de mejoramiento, cuyo fin es cultivar explantes asépticamente de calidad uniforme de fracciones de tejidos u órganos que se extraen de plantas madre de acuerdo con el objetivo perseguido (19). La micropropagación puede efectuarse por tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas *de novo* y embriogénesis somática, posee una tasa de multiplicación ilimitada gracias a la totipotencia que presentan las células vegetales para regenerar una planta completa si reciben los estímulos adecuados (17).

2.1 Etapas de la micropropagación:

En 1974 Murashige propuso tres pasos importantes para tener una excelente micropropagación sin importar la especie que fuera: Establecimiento aséptico del cultivo, Multiplicación, Enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (19). Actualmente, se identifican las etapas o fases bien definidas cumpliendo cada una de ellas objetivos específicos para un desarrollo adecuado (18).

a. Preparación del material vegetal:

En 1998 Pérez mencionó, que la etapa/fase 0 fue creada con la necesidad de disminuir los problemas de contaminación que se presenta comúnmente en la etapa I (establecimiento del cultivo), en la actualidad es considerada de suma importancia e indispensable para un eficiente y repetible trabajo. La etapa/fase 0 se refiere a la selección y preparación de la planta madre/donante de explantes siendo seleccionada por sus características fenotípicas especiales y por contar con vigorosidad, salud y permanecer bajo condiciones higiénicas, que ayudan a reducir los contaminantes microbianos especialmente los fúngicos. (18)

b. Establecimiento del cultivo:

En esta etapa I se inicia el cultivo *in vitro* con la introducción de los explantes en el medio de cultivo en condiciones de esterilidad y con el objetivo de establecer cultivos viables y axénicos teniendo en cuenta el control de la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. (18) (17)

El tamaño del explante es un punto importante que está relacionado con la desinfección y regeneración de las plantas, si el explante es pequeño es menor el riesgo de contaminación pero más difícil la regeneración, cuanto más grande sea el explante las probabilidades de contaminación serán también mayores pero más rápido el crecimiento y la regeneración directa de órganos. (18)

La producción de cultivos axénicos se puede lograr con aspectos preventivos como curativos, ya que en esta etapa se puede observar contaminación microbiana asociada a la sobrevivencia a los tratamientos de esterilización o desinfección, los patógenos latentes

podrían combatirse con el uso de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo. (17)

2.2 Problemas frecuentes en la micropropagación

Presenta algunos problemas de acuerdo con la variedad y el cultivo que se trabaje, uno de los problemas más importantes es la contaminación microbiana que es cualquier microorganismo presente en el medio de cultivo que provoca la muerte del tejido porque compiten por los nutrientes y modifican el medio de cultivo. (18)

a. Oxidación o Ennegrecimiento:

La oxidación está asociada con el estrés oxidativo que se podría vincular como el resultado del uso de agentes desinfectantes en la asepsia del explante, en los cortes del explante, cambios del pH, composición del medio de cultivo y el volumen. Provocando oscurecimiento del explante, ocasionando daño, inhibición del crecimiento, necrosis y la muerte del explante, existen varias maniobras para escapar de la oxidación del explante como: usar explantes en estado juvenil, reducir la temperatura, reducir la intensidad de luz, realizar subcultivos con frecuencia, agregar antioxidantes, cultivar el explante en medio líquido, usar adsorbentes como carbón activado, reducir el tiempo de esterilización del explante, entre otros. (18)

b. Vitrificación o Hiperhidricidad:

La vitrificación o Hiperhidricidad es cuando los brotes toman una apariencia vítreo y transparente, mostrando turgencia y fragilidad en las hojas y tallos, este problema está determinado por dos factores importantes como la humedad relativa y el potencial de agua afectando a la fotosíntesis y a la transpiración. Se identifica por ser un proceso de morfogénesis anormal con desordenes fisiológicos (mayor consumo de agua, bajos niveles de clorofila, baja capacidad fotosintética, hipolignificación), anatómicos (cutículas delgadas y epidermis) y morfológicos en condiciones de cultivo in vitro. (18)

c. Contaminación microbiana:

Uno de los problemas más importante y persistente hasta la actualidad es la contaminación microbiana en las etapas de la micropropagación, existen diversos tipos de microorganismos que pudieran estar presentes como: bacterias, hongos, levaduras y virus. (18)

El ambiente generado para el cultivo de explantes es beneficioso para la proliferación de diversos patógenos que pueden dañar, modificar o competir con el explante por los nutrientes del medio de cultivo, siendo muy dificultoso tener explantes o cultivos asépticos. Las fuentes microbianas frecuentemente presentes en los cultivos *in vitro* son: **las Bacterias:** *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, y *Corynebacterium*. **Hongos filamentosos:** *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, y *Neurospora*. (18)

El género *Bacillus spp.*:

Es aeróbico, anaeróbico facultativo o anaeróbico, siendo células en forma de bastón capaz de producir endosporas de forma cilíndrica elipsoidal o esférico, que se encuentran en el centro de la célula ubicadas de forma subterránea o terminal, algunas especies presentan movilidad por medio de flagelos peritricos pero por lo general no presentan movilidad. Algunas especies son capaces de crecer a 55 °C, principalmente los saprófitos comúnmente encontrados en el suelo, en ciertos animales o parásitos de insectos o patógenos. (20)

El género *Bacillus* está conformado por más de 40 especies de bacilos grampositivos, esporulados, que crecen mejor en condiciones aerobias. La mayoría de ellas son saprófitas que se encuentran comúnmente en el suelo, agua, vegetales y en el aire. La especie de mayor importancia patológica es *B. anthracis*, causante de la enfermedad del ganado ántrax o carbunco, que puede afectar al hombre de manera ocasional asociándolo al trabajo de los veterinarios, granjeros y agricultores. El *B. Cereus* es la especie más reconocida y aislada por su relación con la intoxicación alimentaria por la producción de una

enterotoxina y las especies de *B. cereus* y *B. subtilis* a menudo son aislados como contaminantes de medios de cultivo. (21)

2.3 Control preventivo de la contaminación microbiana

El éxito de la micropropagación *in vitro* depende mucho del control y prevención de la contaminación microbiana. Actualmente, la contaminación es un problema primordial y severo para los micropropagadores de plantas en el mundo, algunos factores tan disímiles como el diseño del lugar de trabajo, la procedencia, la higiene ambiental, la edad del explante inicial, entre otros, pueden favorecer o controlar la incidencia de contaminantes microbianos (18). Si el explante presenta patógenos superficialmente la eliminación de ellos sería durante la desinfección, pero si se presenta al interior del explante la eliminación sería dificultosa, se utilizaría fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo siendo algunos productos de amplio espectro que se pueden usar como: el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomycin (10 a 50 mg/L) (19). La pronta detección de las fuentes como el tipo de microorganismo presente, ayudan a contar con un plan de respaldo para controlar los patógenos y así tener éxito en los cultivos *in vitro* (18).

2.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico-desinfección:

La desinfección superficial de los explantes con el uso de compuestos químicos para eliminar los patógenos tratando de generar el menor daño posible para los explantes (18). En la desinfección los compuestos más comunes utilizados son: las soluciones de Hipoclorito de sodio, Hipoclorito de calcio, Peróxido de Hidrógeno, Bicloruro de Mercurio, Nitrato de Plata, Etanol y otros, a diferentes porcentajes y tiempos de exposición (19) (18).

Puede ser de utilidad que los explantes sean sometidos a inmersión en soluciones con antibióticos y/o antimicóticas (gentamicina, carbenicilina, ampicilina, tetraciclina, sulfato de estreptomycin, sulfato de gentamicina, anfotericina, benomil, pentacloronitrobenzeno, rifampicina, carbendazim, entre otros), pero tener en cuenta que estos productos pueden alterar la composición del medio de cultivo y ser metabolizados por los explantes. Se

aconseja usar agua destilada estéril recién preparada ya que está demostrado que guardar extendidamente el agua estéril puede contaminar con bacterias el material vegetal. (18)

Hipoclorito de sodio (NaClO). En concentraciones del 1-3 % es una solución muy útil como germicida y agente oxidante, hace muchos años que se viene usando Hipoclorito de sodio para la esterilización superficial del material vegetal mientras no cause lesiones debido a su acción blanqueadora, se le considera por la ventaja de remover del explante fácilmente mediante enjuagues eliminando los residuos oxidantes indeseables, por la indeseable alcalinidad de los Hipocloritos residual sería útil un enjuague rápido con agua acidulada (una solución muy diluida y una cantidad para neutralizar cualquier exceso). El Hipoclorito de calcio en concentraciones de 6 -12 % puede remplazar al Hipoclorito de sodio. (19) (18)

3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La microbiología estudia a los microorganismos que forman un importante grupo de organismos primitivos y simples con habilidad de llevar procesos biológicos, el grupo está compuesto por bacterias, algas, hongos y protozoos (22). En el laboratorio se preparan o seleccionan medios de cultivos adecuados a las necesidades de crecimiento de las bacterias que cuentan con necesidades nutritivas y físicas para el cultivo de los microorganismos (23). Teniendo el medio de cultivo se aísla el microorganismo de la muestra causante de los problemas que permita la identificación (clasificación dentro de un grupo o taxón ya establecido), la dificultad de este proceso dependerá de la precisión o discriminación al cual se va a llegar y al estudio de su sensibilidad ante los antimicrobianos apropiados (24).

3.1 Aislamiento:

El aislamiento es obtener cultivos puros es decir microorganismos de una sola célula (llamados clon), existen dos formas de obtener un cultivo puro, el primero sería el Aislamiento directo: se siembra la superficie del medio sólido con un asa y Aislamiento previo enriquecimiento: se inocula la muestra en medio selectivo líquido cuando existe

poca población, después se siembra en el mismo medio pero en sólido para conseguir el aislamiento. (22)

3.2 Métodos fenotípicos de identificación bacteriana

La identificación bacteriana suele usar métodos convencionales basándose en las características fenotípicas ya que por su desarrollo y costo los hace más asequible. La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características observables de las bacterias como la morfología, pruebas bioquímicas y metabólicas destacándose las: características microscópicas, características macroscópicas, medios de cultivo como también las pruebas bioquímicas. (25)

3.2.1 Características Microscópicas:

Tinciones: Para la identificación bacteriana las tinciones son el primer paso a seguir siendo una herramienta muy importante (26), las tinciones son soluciones de colorantes acuosos que tienen distintos objetivos como: visualizar a los microorganismos y otras células de diferentes especímenes, también exhiben algunas de sus características morfológicas y estructuras como: esporas, flagelos, gránulos, cápsulas, etc. Según el comportamiento tintorial se diferencia a los microorganismos (21).

Las tinciones se clasifican como tinciones simples, en el caso de usar un solo colorante como la tinción de tinta china o azul de lactofenol y son tinciones diferenciales, combinadas o compuestas; en el caso de usar más de un colorante simultánea o sucesivamente como la tinción de Ziehl-Neelsen o Gram con el objetivo de mostrar diferencia en las estructuras de las células. (21) (27)

Las tinciones frecuentemente más utilizadas e imprescindibles son: azul de metileno, Ziehl-Neelsen, Kinyoun, May Grünwald-Giemsa y la de Gram, esta última ayuda a separar en dos grandes grupos a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas distinguiendo su morfología y forma de agruparse. Es de suma importancia tomar apuntes de la morfología (coco, bacilo o cocobacilo), la resistencia a la decoloración (bacilos ácido resistentes) y la

disposición (pares, racimos o cadenas), también existen tinciones para observar estructuras como: flagelos, capsula, materiales de reserva, esporas y etc. (22) (23) (26)

3.2.2 Características Macroscópicas:

Pruebas Bioquímicas: Las pruebas bioquímicas posibilitan definir las características metabólicas de las bacterias a identificar para saber a qué familia, género, especie o grupo pertenece una bacteria y a diferenciar bacterias muy relacionadas (23). Algunas pruebas bioquímicas son de desarrollo fácil y rápido utilizando colonias aisladas de medios de cultivo que facilitan la diferenciación presuntiva de diferentes grupos o especies microbianas. Además, ayudan a seleccionar pruebas adicionales esenciales para una identificación definitiva. (24)

Existen algunas pruebas que son usadas como multipuebas como el medio de cultivo TSI (Triple Azúcar Hierro) después de incubar entre 18 y 24 horas se examina simultáneamente observando la fermentación de glucosa, acidez a partir de lactosa y/sacarosa, producción de ácido sulfhídrico, producción de gas y más la utilización de otras pruebas para definir la capacidad de la bacteria a generar ciertas enzimas como; fosfatasa alcalina, oxidasa, coagulasa, catalasa y entre otros. Se obtiene una buena orientación sobre la probable identidad de la bacteria ya que existen pruebas bioquímicas que son definitorias que otorgan información necesaria para la identificación. (23)

Los medios de cultivo microbiológico nos brindan información muy importante que nos es útil para aislar e identificar a los microorganismos siendo a veces necesario añadir o eliminar componentes en un medio básico con el propósito de cultivar, diferenciar, enriquecer y/o aislar un determinado grupo de bacterias. (23) (24)

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo con la función que cumplen, como los medios selectivos que están formulados para el crecimiento de un conjunto de microorganismos ayudando a seleccionar un tipo de bacteria y a eliminar otros microorganismos que se encuentren mezclados en una muestra, se consigue la diferenciación añadiendo al medio básico o basal colorantes como: el cristal violeta o antibióticos para inhibir el crecimiento de un grupo microbiano de forma selectiva, estos

son algunos medios selectivos más utilizados como: Agar Chapman (Agar Manitol Salado) para seleccionar *Staphylococcus*, Agar MacConkey, Agar SS para seleccionar *Salmonella* y *Shigella*, Agar XLD y muchos más. (23)

3.3 Identificación Bacteriana

Se procede a la identificación de la bacteria de análisis después de haber desarrollado una serie de pasos previos como el aislamiento y las pruebas fenotípicas. Posterior a ello, se tiene conocimiento de las características morfológicas y también el comportamiento frente a las tinciones, a las pruebas bioquímicas y mecanismos de resistencia. (26)

La identificación de una bacteria que ocasiona problemas como la contaminación es el principal motivo de diagnóstico y búsqueda de tratamientos para los problemas ocasionados por estas contribuyendo a diferenciar e identificar entre los grupos microbianos existentes. (24)

3.3.1 Taxonomía bacteriana

La taxonomía es la ciencia de clasificación biológica que clasifica en grupos (taxones) a los microorganismos de acuerdo con su afinidad o similitud asignando nombres a las bacterias e identificando microorganismos desconocidos localizándolos en taxones conocidos. La taxonomía como requiere de agrupar y clasificar a los microorganismos emplea caracteres o criterios para agrupar como; temperatura, características tintoriales, categorías nutricionales (autótrofas, heterótrofas), respuestas al oxígeno (aerobias, anaerobias) y entre otros. Posterior a ello, hacer una interpretación minuciosa de los resultados. (22) (26)

La taxonomía en general se basa en las características morfológicas, en las propiedades bioquímicas, nutricionales, fisiológicas y el proceder en los medios de cultivo que brindan información para una caracterización, clasificación y la nomenclatura. Es fenotípica y filogenética los principales esquemas de clasificación, la fenotípica se enfoca en características visuales de un microorganismo y la filogenética considera la evolución ancestral de los seres vivos. Se obtienen los caracteres fenotípicos de (26):

- ✓ Morfología bacteriana: aspecto, tamaño, esporas, cápsulas y flagelos.
- ✓ Apariencia en medios de cultivo: morfología, superficie, elevación, márgenes, textura, opacidad y pigmentación.
- ✓ Propiedades fisiológicas: temperaturas, pH, cloruro sódico y atmósfera libre de O₂.
- ✓ Propiedades bioquímicas: utilización de hidratos de carbono, metabolismo de nitrógeno, tipo de enzimas respiratorias y degradación de macromoléculas.
- ✓ Necesidades nutricionales
- ✓ Características quimiotaxonómicas: membrana celular, tipo de pared celular, proteínas y lipopolisacáridos.
- ✓ Inhibición por sustancias: colorantes, antibióticos, fagos y bacterias.
- ✓ Pruebas serológicas y genómicas.

Existe una diferencia entre la taxonomía e identificación de bacterias donde la taxonomía conduce a una caracterización exhaustiva usando la teoría, métodos de clasificación, localización de grupos y la nomenclatura, mientras la Identificación es la parte práctica de la taxonomía que caracteriza a un aislamiento por medio de análisis seleccionados y asigna a una especie conocida al aislamiento sugiriendo un estudio taxonómico minucioso. (22) Los científicos que trabajan en la taxonomía dando la nomenclatura a las bacterias a través del uso de reglas internacionales desarrolladas y aplicadas por ellos. En el Código Internacional de Nomenclatura de las Bacterias (Internacional Code of Nomenclature of Bacteria) se encuentran las reglas con algunos fundamentos (26):

- 1) Solo existe un nombre correcto para una bacteria, (el nombre dado a las bacterias nunca será inequívoco y es reconocido internacionalmente).
- 2) Los nombres que causen error o confusión serán rechazados.
- 3) Todos los nombres son en latín o latinizados o derivados del griego.

4. ANTIBIOGRAMA - Prueba de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad bacteriana son una tarea importante de los laboratorios que desarrollan mediante un antibiograma, cuyo fin es evaluar la respuesta de un microorganismo a los antibióticos y los resultados deben ser correctamente interpretados. (28)

Las pruebas del antibiograma cuentan con normas que precisan pautas entre los laboratorios y estandarizan los protocolos (29). Las normas o parámetros de referencia son obtenidos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de los EE.UU. y del EUCAST Europeo, estas normas son renovadas anualmente, los parámetros señalados para los resultados por el CLSI, EUCAST y la Subcomisión de Antimicrobianos son: sensible, resistente e intermedio (30). (29) (30)

4.1 Parámetros a Estandarizar

Los Parámetros a tomar en cuenta son el tipo de bacterias a analizar, será un microorganismo de crecimiento rápido o lento, aerobio o anaerobio, exigente o no exigente, los medios de cultivo adecuados para las pruebas de sensibilidad de acuerdo con las normas es el Agar o el Caldo Mueller Hinton (MH) con una profundidad de 4 mm. Además, del tiempo de incubación será entre 18-24 horas aproximadamente y los antibióticos a utilizar deben ser guardados bajo refrigeración a 8 °C con un desecante si es el caso, teniendo en cuenta la fecha de vencimiento de los discos. (28)

4.2 Método de difusión en disco (Disco-placa):

El antibiograma del método de difusión en disco (disco-placa), es un método cualitativo que se utiliza para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido como también para microorganismos de crecimiento exigente y sus resultados son bastantes reproducibles así como fácil de estandarizar . (28)

El método se caracteriza en la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento alrededor del disco impregnado con un antimicrobiano midiendo la zona de

inhibición en milímetros. La interpretación está relacionada entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada microorganismo y antimicrobiano. (31)

4.3 Discos de sensibilidad

Los discos para los antibiogramas son elaborados por casas comerciales bajo un control internacional, los discos presentan una concentración predeterminada, facilitando una correlación más o menos exacta con la concentración mínima inhibitoria que el antibiótico logra "*in vivo*" según los resultados de resistencia o susceptibilidad. (32)

La conservación de los discos es un punto importante ya que de ello depende la confiabilidad de los resultados de la prueba. Teniendo en cuenta las siguientes indicaciones como: los frascos individuales de discos deben estar refrigerados a 4-5 °C o almacenados a -20 °C hasta el momento de su uso, los discos que pertenecen a la familia de las penicilinas o de las cefalosporinas deben estar siempre congelados, salvo los discos de uso diario que pueden mantenerse refrigerados hasta por una semana. (32)

Los discos con dispensador para pruebas de susceptibilidad deben estar refrigerados con un desecante pero deben estar a temperatura ambiente antes de ser utilizados. Los discos cuya fecha de vencimiento puesta por la casa comercial estén expirados deberán ser desechados y los discos deben estar secos hasta el momento de su uso. (32)

4.3.1 Antimicrobianos recomendados:

En la ejecución del antibiograma se recomienda seleccionar primero los antimicrobianos a emplearse frente al microorganismo problema, ya que no es recomendable, económico, razonable e imposible utilizar todos los antimicrobianos existentes en el mercado. La selección del antibiótico será por parte del personal del laboratorio que elabora el estudio.

Con el propósito de disponer de una guía general para el desarrollo de un antibiograma seleccionando antimicrobianos, puesto que como regla general se puede seleccionar antimicrobianos para microorganismos Gram positivos y Gram negativos (32). La Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el EUCAST Europeo recomiendan antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de microorganismos (33).

Principales Grupos de Antibióticos en la selección del antimicrobiano:

El disco de Penicilina G: representativo de todas las penicilinas G, el disco de Ampicilina: representativo de todas las Aminopenicilinas, el disco de Oxacilina: representativo de todas las penicilinas resistentes a Beta-lactamasas, el disco de Cefalotinas: representativo de todas las cefalosporinas de primera generación, el disco de Tetraciclina: representativo de todas las Tetraciclinas, Gentamicina, Amikacina, Tobramicina, Kanamicina, Sisomicina y Netilmicina, los Macrólidos y las Lincomicinas. (32)

4.4 Lectura e Interpretación de los Resultados

La lectura de los antibiogramas se lleva a cabo por la medición del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano incluyendo el diámetro del disco, esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma. La interpretación de la sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada bajo estas tres categorías: sensible (S), intermedio (I) o resistente (R). (28) (29)

La interpretación está basada en la respuesta *in vitro* del microorganismo en estudio frente a un antimicrobiano. Los puntos de corte y la interpretación se toman en cuenta bajo los criterios de interpretación que precisan las normas o parámetros de referencia que son obtenidos en el CLSI, el EUCAST y la Subcomisión de Antimicrobianos. (31) (33)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES

Muestras y/o Unidades Biológicas

- Especie vegetal arándano (*Vaccinium Corymbosum*) variedad Biloxi.

Material de vidrio de laboratorio

- Beakers de 100 mL, 500 mL y 1000 mL Schott Duran
- Pípetas de 5 mL y 10 mL Kimax
- Baguetas de vidrio
- Fiolas de 100 mL, 500 mL, 1000 mL Pyrex
- Probetas de 500 mL y 100 mL Kimax
- Placas Petri (Ø90 mm) Pyrex
- Tubos de ensayo de 30 mL Kimax

Equipos

- Balanza analítica portátil OHAUS SCOUT PRO 200 g, modelo SP-202
- Cámara de flujo laminar Compañía C4
- Autoclave HW KESSEL, modelo 290104
- Cocina Eléctrica MAGEFESA, modelo MGF 8022
- pH-metro HANNA INSTRUMENTS, modelo pH-213
- Refrigerador COLDEX, modelo CA-29
- Micropipeta de 1000 uL y 50 uL Biohit
- Microscopio CARL ZEISS modelo “PRIMO STAR”

Insumos y Reactivos Químicos

- Medio de cultivo Woody Plant (WPM)
- Agar – Agar (Sigma-Aldrich)
- Etanol 96% v/v NACIONAL
- Hipoclorito de sodio NaClO 7.8% (Diproquin)
- Ácido Naftalen acético (ANA) (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de calcio (CaCl₂.2H₂O) (Roche)
- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) (Roche)
- Antibióticos: (Bencilpenicilina y Amoxicilina)
- Discos de sensibilidad (Biodisc Sac, Oxoid-UK y BBL)
- Kit de tinción Gram (proporcionado por la universidad)
- Agar Hugh-Leifson O-F (Merck)
- Agar MacConkey (Merck)
- Agar Manitol Salado (Sigma-Aldrich)
- Agar Hierro de Kliger (Merck)
- Agar Salmonella-Shigella (Merck)
- Medio S.I.M (Merck)
- Agar Urea (Sigma-Aldrich)
- Agar Citrato de Simmons (Merck)
- Agar Nutritivo (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)

Otros

- Bolsas de Polipropileno (PlasticWrap) Corsun Perú
- Papel Aluminio
- Plástico Adherente (PlasticWrap) Corsun Perú

6. MÉTODOS

6.1 Tipo de Investigación:

Es un trabajo de investigación aplicada siendo una propuesta de laboratorio que nos brindará información sobre la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), ante la necesidad de tomar medidas preventivas para disminuir los porcentajes de contaminación bacteriana, así como la caracterización mediante pruebas bioquímicas y microscópicas de la bacteria que afecta su micropropagación *in vitro*, con vistas futuras de una micropropagación masiva *in vitro* de esta especie vegetal.

6.2 Lugar de Ejecución:

El presente proyecto de investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) de Arequipa, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica.

6.3 Material Vegetal:

Se emplearon segmentos nodales de plántulas juveniles de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano) de la variedad Biloxi, provenientes de un vivero de la ciudad de Arequipa llamado "Ecología y Flora S.A.C" ubicado en la Av. Arequipa 669 Cerro Viejo en el distrito de Cerro Colorado-Arequipa. Las plantas madres presentaron buenas características físicas gozando de vigorosidad y pigmentación sin la presencia de enfermedades por bacterias u hongos, cumpliendo así con todos los cuidados fitosanitarios. Se mantuvo las plantas madre bajo condiciones requeridas para su desarrollo.



Figura 1: Plantas madre de arándano variedad Biloxi.

6.4 PROCEDIMIENTO:

Corresponde a los tratamientos de la fase de establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano) en la evaluación de la contaminación microbiana, oxidación y viabilidad de los explantes. Posterior a ello, el análisis microbiológico del contaminante bacteriano y finalmente un análisis de sensibilidad bacteriana.

a. Pretratamiento de muestras

Se seleccionaron segmentos nodales de plantas madre, que fueron cortados en segmentos medianos con una tijera previamente desinfectada con etanol al 96 % para evitar la contaminación cruzada o externa, se almacenaron los explantes en un recipiente de plástico que contenía algodón húmedo para evitar la deshidratación durante el transporte hasta el laboratorio. En el laboratorio se retiró todas las hojas de los explantes y fueron lavados tres veces con agua del caño para retirar impurezas del ambiente. Después, se lavaron en una solución jabonosa durante 5 minutos y por último se enjuagó tres veces con agua destilada. Todo el proceso se realizó de manera cuidadosa para preservar las yemas intactas. Posterior al pretratamiento, recién se sometió los explantes a diferentes tratamientos de desinfección superficial.



Figura 2: Explantes (segmentos nodales) de arándano (*Vaccinium Corymbosum*).

6.4.1 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DE DESINFECCIÓN:

En la desinfección, se aplicaron sustancias desinfectantes y antibióticos para disminuir los porcentajes de contaminación presente en la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum*.

6.4.1.1 Efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %:

Una vez finalizado el pretratamiento, en la cámara de flujo laminar se realizó a los explantes alrededor de tres enjuagues con agua destilada estéril y se sumergió en etanol al 70 % durante 1 minuto, luego fueron trasladados a una solución fúngica de amplio espectro por 40 minutos en agitación constante a 100 rpm. a la que se añadió Tween 20. Posteriormente, se sometió a los explantes a la solución NaClO al 3 % evaluándose los tres tiempos de inmersión de 4, 6 y 8 minutos. Ver tabla 1

Después de cada tratamiento de desinfección el material vegetal se enjuagó tres veces con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de Hipoclorito de sodio restantes y durante la siembra del material vegetal se mantuvo en una solución antioxidante de 500

mg/L de ácido cítrico y 250 mg/L de ácido ascórbico (previamente esterilizados). Finalmente, se eliminó los extremos de cada uno de los explantes para ser sembrados en el medio de cultivo Woody Plant (WPM) (Anexo H).

6.4.1.2 Efecto combinado del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % con antibióticos:

Una vez finalizado el pretratamiento, en la cámara de flujo laminar se realizó a los explantes alrededor de tres enjuagues con agua destilada estéril y se sumergió en etanol al 70 % durante 1 min, luego fueron trasladados a una solución fúngica de amplio espectro por 40 min en agitación constante a 100 r.p.m. a la que se añadió Tween 20. Posteriormente, se sometió a los explantes a inmersión en solución NaClO al 3 % a tres tiempos de inmersión de 4, 6 y 8 minutos.

Después de cada tratamiento de desinfección el material vegetal se enjuagó tres veces con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de Hipoclorito de sodio restantes. Luego a ello, se sumergió el material vegetal en los antibióticos Bencilpenicilina y Amoxicilina al 1% cada uno por separado por un periodo de 5 minutos, los tratamientos se presentan en la tabla 1. Finalmente, durante la siembra el material vegetal se mantuvo en una solución antioxidante. Se cortaron los extremos de cada uno de los explantes para ser sembrados en el medio de cultivo Woody Plant (WPM).

Tabla 1: Tratamientos evaluados en la desinfección de segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

Tratamientos	Soluciones
T1	4 minutos NaClO 3%
T2	6 minutos NaClO 3%
T3	8 minutos NaClO 3%
T4	4 minutos NaClO 3% + 5 min Amoxicilina
T5	6 minutos NaClO 3% + 5 min Amoxicilina
T6	8 minutos NaClO 3% + 5 min Amoxicilina
T7	4 minutos NaClO 3% + 5 min Bencilpenicilina
T8	6 minutos NaClO 3% + 5 min Bencilpenicilina
T9	8 minutos NaClO 3% + 5 min Bencilpenicilina

El material vegetal fue llevado a los anaqueles de crecimiento, primero fueron puestos bajo oscuridad durante siete días y posteriormente expuestos a fotoperiodos de luz (2000 Lux) de 16 horas a una temperatura ambiente de 21 °C a 22 °C donde permanecieron por 30 días bajo observación. La evaluación se realizó visualmente cada siete días durante treinta días, tomando en cuenta el número de explantes contaminados con hongos o bacterias, explantes oxidados y explantes viables.

Procesamiento de Datos

Los tratamientos de desinfección ensayados fueron realizados por triplicado cada uno de ellos y el procesamiento de los datos estadísticos de las variables estudiadas se llevó a cabo con el paquete estadístico Statistic Package for Social Science (IBM SPSS) versión 25 para Windows.

Los datos estadísticos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas y se realizó también la prueba de tukey de comparaciones múltiples de medias, a un nivel de significancia del 0.05 con un intervalo de confianza del 95 %.

6.4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:

Se realizó el aislamiento, identificación y el antibiograma del contaminante bacteriano resistente al proceso de desinfección superficial del material vegetal de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano).

6.4.2.1 Aislamiento bacteriano:

Debido a la consecuente aparición de contaminación bacteriana en el material vegetal *in vitro*, se aisló las bacterias que afectaron los segmentos nodales de la fase de establecimiento y así conocer el género microbiano al que pertenece para tomar futuras medidas de control y prevención contra este patógeno.

Material de estudio:

En esta parte del estudio se seleccionó y separó los explantes que mostraban contaminación bacteriana visible, presentándose sobre el medio de cultivo WPM o en la base de los explantes de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano).



Figura 3: Segmentos nodales con contaminación bacteriana en la superficie del medio de cultivo in vitro.

Procedimiento: La recolección se efectuó rigurosamente para no contaminar la muestra con agentes externos, se visualizó y se tomó nota de las características de crecimiento bacteriano de los microorganismos contaminantes en el medio de cultivo antes de ser aislado.

Se aisló los contaminantes bacterianos directamente de la superficie de los frascos de incubación haciendo uso de un asa de kolle, fueron sembradas bajo la técnica de siembra por agotamiento por estría en placas Petri (\emptyset 90 mm) con el medio de cultivo Agar Nutritivo (estéril previamente). Finalmente, se selló con parafilm y se tuvo bajo incubación las placas a 37 °C durante 24-72 horas, se realizó resiembras en Agar Nutritivo hasta que se obtuvo cultivos puros de la bacteria a analizar. Una vez obtenidos los cultivos puros se tomó nota de las características morfológicas que presentaban las colonias bacterianas.

6.4.2.2 Identificación bacteriana:

La identificación bacteriana fue basada en características fenotípicas por ser más asequibles, estas se basan en características observables de las bacterias como la morfología, las características microscópicas, las características macroscópicas y pruebas bioquímicas. (25)

a. Características microscópicas:

Se realizó primero la evaluación de las características microscópicas del cultivo puro aislado previamente, las tinciones realizadas fueron la tinción de Gram, tinción de Wirtz-Conklin (*Schaeffer-Fulton*) y la tinción Ziehl-Neelsen (BAAR) ellas ayudaron a visualizar la manera de agruparse, la estructura, forma de célula y exhibió sus características estructurales de la bacteria en estudio.

b. Características macroscópicas:

Después de las características microscópicas (primer paso de la identificación preliminar), se realizó las pruebas bioquímicas haciendo uso de reactivos y de medios de cultivo diferenciales como enriquecidos para identificar el género al que pertenece la bacteria. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Prueba de Oxidasa, Prueba de Catalasa, Fermentación de carbohidratos, Prueba de oxidación/fermentación: (Hugh-Leifson(O/F)), Prueba de Urea, Prueba de Voges – Proskauer, Caldo RM – VP, Prueba de Rojo de metilo, Prueba de Sulfuro, indol, movilidad: Medio SIM, Prueba de Indol, Agar hierro y triple azúcar: TSI, Agar Citrato de Simmons, Agar de hierro lisina, Agar TCBS, Agar Mueller–Hinton, Agar Manitol Salado, Agar MacConkey, Agar Dextrosa Sabouraud y Agar Salmonella-Shigella.

Se realizó cada una de estas pruebas por triplicado para despejar cualquier duda con respecto al grupo al que pertenece la bacteria en estudio, todos los medios de cultivo usados fueron elaborados teniendo en cuenta las indicaciones en la etiqueta hechas por los fabricantes de los medios. Los resultados fueron leídos visualmente después de haber concluido su tiempo de incubación se identificó el género microbiano al cual pertenece la bacteria en estudio usándose el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) (20).

6.4.3 ANTIBIOGRAMA: Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Se realizó el antibiograma mediante el método modificado de disco-placa de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk (1966) el método consiste en medir la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos (32), produciendo una susceptibilidad a los antibióticos por parte de la bacteria contaminante aislada e identificada del medio de cultivo de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano). (32)

En el estudio de la sensibilidad del microorganismo aislado frente a los antibióticos, para la evaluación se seleccionaron antimicrobianos probados rutinariamente y comúnmente en los ensayos de antibiogramas. Así como el uso de discos de sensibilidad representativos de los grupos clasificatorios de los antibióticos como el disco de Penicilina G que es representativo de todas las penicilinas G, el disco de Ampicilina que es representativo de todas las Aminopenicilinas como: Talampicilina, Pivampicilina, Bacampicilina, Hetacilina, Amoxicilina y Epicilina. El disco de Tetraciclina que es representativo de todas las Tetraciclinas y los Aminoglucósidos como: Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Kanamicina, Sisomicina y Netilmicina. (32)

En la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se empleó discos de sensibilidad comercial de las marcas Biodisc Sac, Oxoid-UK y BBL, se ensayó con los antimicrobianos probados rutinariamente como: amoxicilina/Ac. clavulánico: (AMC), rifampicina (RA), ampicilina: (AM), tetraciclina (TE), penicilina G: (P), kanamicina (K), cloranfenicol (C), vancomicina (VA), amikacina (MK), oxacilina (OX), lincomicina (L), azitromicina (AZT), cefalosporinas (ceftriaxona (CRO) y cefotaxina (CTX)) . Ver tabla 2

a. Preparación del inóculo bacteriano

En el interior de la cámara de flujo laminar, se preparó primero el patrón de turbidez N° 0.5 de la escala McFarland standard (34) . A continuación, se utilizó placas de cultivo puro en Agar Nutritivo incubado no mayor a 24 horas, tomando con el asa de kolle de 3 a 5 colonias hacia un tubo de ensayo con 4 ml de suero fisiológico, preparando una suspensión bacteriana equivalentes al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland. (35)

b. Siembra

Se introdujo un hisopo estéril dentro del tubo que contiene la suspensión bacteriana ajustado al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland, luego presionando en la pared del tubo de ensayo para eliminar el exceso. Seguidamente, se estrió en placas con Agar Mueller-Hinton deslizado el hisopo por la superficie del agar tres veces rotando la placa cada vez, procurando que no quede espacios libres sin cubrir.

Una vez sembrada las placas se procedió a colocar los discos con ayuda de una pinza metálica previamente esterilizada, con mucho cuidado se realizó una pequeña presión sobre ellos teniendo cuidado de no romper el medio de cultivo y asegurándose de que los discos queden bien adheridos al medio. Se incubó por 24 horas a una temperatura de 37 °C, trascurrido el tiempo de incubación se midió los halos de inhibición con una regla. (29) (33)

Los discos de sensibilidad fueron colocados bajo estrictas condiciones de esterilidad sobre la superficie de las placas de Agar Mueller-Hinton, se distribuyó cinco a seis discos de sensibilidad por placa manteniendo una adecuada distancia entre ellos. Se realizó por triplicado la siembra para validar los resultados obtenidos de la prueba de sensibilidad y los resultados de la cepa bacteriana se reportaron bajo estas tres categorías: resistente (R), intermedio (I) o sensible (S) a los antibióticos o antimicrobianos ensayados. (36) (33)

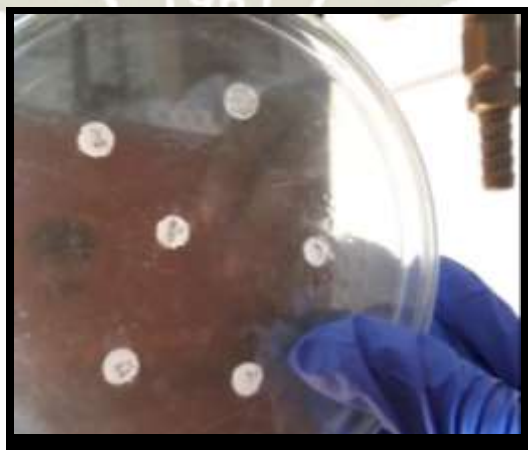


Figura 4: Antibiograma: siembra de los discos de sensibilidad.

Tabla 2: Discos de sensibilidad (Antimicrobianos) usados en el
Antibiograma.

Discos de sensibilidad	Símbolo	Concentración
Penicilina	(P)	10 u
Tetraciclina	(TE)	30 ug
Amoxicilina /ácido clavulanico	(AMC)	30 ug
Rifampicina	(RA)	5 ug
Ampicilina	(AM)	10 ug
kanamicina	(K)	30 ug
Cloranfenicol	(C)	30 ug
vancomicina	(VA)	30 ug
Amikacina	(MK)	30 ug
Oxacilina	(OX)	1 ug
Lincomicina	(L)	2 ug
Azitromicina	(AZT)	15 ug
Ceftriaxona	(CRO)	30 ug
Cefotaxina	(CTX)	30 ug

Fuente propia

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados corresponden a la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano) obtenidos por los tratamientos de desinfección del material vegetal. Además de un análisis microbiológico del contaminante bacteriano y la determinación de la sensibilidad bacteriana.

7. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN:

7.1 Análisis del efecto de la concentración y el tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %:

Los tratamientos 1, 2 y 3 que se muestran en la tabla 3 y 5, son los valores alcanzados en la evaluación de la concentración de Hipoclorito de sodio al 3 % durante 4, 6 y 8 minutos en la desinfección de los segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) durante la fase de establecimiento *in vitro*. Se analizó la presencia de explantes contaminados con microorganismos como bacterias u hongos además de la oxidación y viabilidad de los explantes. Figura 5

- En la evaluación de los explantes contaminados con bacterias, se observó que los patógenos se desarrollaron progresivamente junto con el explante apoderándose del medio de cultivo y compitiendo con ellos por los nutrientes del medio, causando daños y deteriorando progresivamente hasta causar la muerte del material vegetal. En la evaluación se observó también que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión la contaminación disminuye significativamente, observándose que a mayor exposición a la solución

desinfectante tiene mayor efecto pero pudiendo causar estragos en el material vegetal. El tratamiento que presentó un mayor porcentaje de contaminación bacteriana fue el T1 con un 50 % en un tiempo de inmersión de 4 minutos y el tratamiento que permitió los menores porcentajes fue el T3 con un 20.8 % a los 8 minutos.

- En la evaluación de los explantes con contaminación fúngica, se observó niveles casi nulos de contaminación permitiendo un porcentaje del 4.2 % frente a la solución desinfectante.
- En la evaluación de oxidación de los explantes, se observó que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión en la solución desinfectante la oxidación incrementa por lo que a menor tiempo de inmersión menor oxidación, ocasionando oscurecimiento y deterioro progresivo hasta causar la muerte del material vegetal. Presentó un mayor porcentaje de oxidación el T3 con un 37.5 % en un tiempo de inmersión de 8 minutos y el menor porcentaje fue el T1 con un 8.3 % a los 4 minutos.
- En la evaluación de la viabilidad de los explantes, se observó que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión la viabilidad disminuye, por lo que a menor tiempo de inmersión mayor viabilidad. Se obtuvo buenos resultados en Hipoclorito de sodio al 3 %, generando porcentajes altos de viabilidad o sobrevivencia del explante presenciando un buen porcentaje con el T2 a los 6 minutos de inmersión.

Tabla 3: Porcentajes del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %.

Hipoclorito de sodio al 3 %					
Tratamientos	Tiempo de inmersión (min)	Bacterias	Hongos	Oxidación	Viabilidad
T1	4	50.0 %	16.7 %	8.3 %	25.0 %
T2	6	37.5 %	4.2 %	12.5 %	45.8 %
T3	8	20.8 %	4.2 %	37.5 %	37.5 %

Fuente propia

Hipoclorito de sodio al 3 %

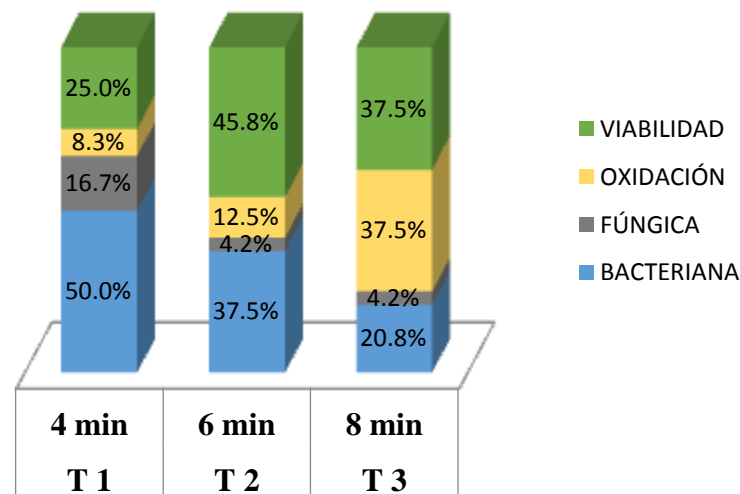


Figura 5: Porcentajes de Hipoclorito de sodio al 3 % en la desinfestación de segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

En la tabla 3 se presenta los resultados de la inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % resultando la T2 ser el más adecuado método de desinfección, presentando valores de contaminación bacteriana y fúngica del 37.5 % y del 4.2 % con una menor oxidación del 12.5 % y ofreciendo una buena viabilidad de explantes del 45.8 %. Siendo estos resultados exhibidos muy similares con el trabajo de Vilma Jiménez y Ana Abdelnour (37) (38) que emplearon la misma concentración de Hipoclorito de sodio pero en periodos más amplios de inmersión de 10 y 15 minutos, ellos disminuyeron sus porcentajes de contaminación significativamente (55 % y 50 % respectivamente). Posada Pérez L, Gómez Kosky R, etc. (39) emplearon concentraciones de Hipoclorito de sodio de 2 y 3 % en la desinfección del híbrido de papaya resultando un control total de los contaminantes microbianos, sin embargo, tuvieron también severos daños a los tejidos que ocasionaron la muerte, siendo los mejores resultados a bajas concentraciones de este desinfectante. De acuerdo a diversos autores (40) (6) (41) (42) (43) (44) han empleado el Hipoclorito de sodio para la desinfección de los brotes o yemas de las plantas de invernadero o campo en un rango de concentraciones de cloro activo entre 0.3, 1.0, 1.25 y 5.25 % (39).

En este estudio se tomó la decisión de periodos de inmersión más cortos para no dañar gravemente los segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), como mencionan en el estudio de Niubó E, Díaz P, Olivia O, etc. (45) que describe ejemplos de una metodología para la descontaminación de microorganismos en el cual combino un biocida de acción superficial con uno sistémico de amplio espectro. En el trabajo de Brenes Angulo A, etc. (46) probaron cuatro variedades de cultivares de arándanos (*Vaccinium spp.*), obteniendo porcentajes de explantes libres de contaminación y la oxidación varió de 18 % y 11 % para Sharpblue a 76 % y 80 % para Woodard, con una media de 56 % y 47 % para segmentos nodales y secciones de hoja, respectivamente.

Se seleccionó al Hipoclorito de sodio como desinfectante superficial del material vegetal por ser comúnmente utilizado en la desinfección *in vitro*, por ser un agente eficiente, no tóxico y de fácil acceso. Lográndose buenos resultados con el Hipoclorito de sodio al 3 % observándose la disminución porcentual de la contaminación microbiana a medida que se aumentó el tiempo de inmersión de la solución desinfectante, alcanzándose explantes casi libres de contaminación fúngica y muy buena viabilidad a los 6 minutos de exposición.

7.2 Análisis del efecto combinado del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % con dos antibióticos:

Los tratamientos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 consistieron en evaluar el Hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % más la inmersión en antibióticos amoxicilina y bencilpenicilina por separado en la desinfección de segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) durante la fase de establecimiento *in vitro*. Se muestran los valores alcanzados en la figura 6 y la tablas 4.

- En la evaluación de los explantes contaminados con bacterias, se observó que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión en la solución desinfectante hay mayor efecto y la contaminación disminuye significativamente. Se visualizó también que con la presencia de antibióticos disminuyó significativamente los porcentajes de proliferación de bacterias con respecto a inmersión solo en Hipoclorito de sodio (3 %), pero se percibió que los patógenos se desarrollaron progresivamente junto con el explante apoderándose del medio de cultivo y compitiendo con ellos por los nutrientes del medio, causando daños y deterioro progresivo del material vegetal hasta su muerte. Hubo una diferencia en los porcentajes entre los dos antibióticos estudiados, teniendo mejores resultados en los tratamientos con bencilpenicilina generando el menor porcentaje de contaminación bacteriana el T9 con un 4.2 % a los 8 minutos de inmersión con respecto a los tratamientos con amoxicilina siendo su menor porcentaje el T6 con un 16.7 % también a los 8 minutos.

- En la evaluación de los explantes con contaminación fúngica, no registro algún problema siendo la solución desinfectante altamente eficiente en controlar la presencia de hongos en los explantes, presenciándose niveles casi nulos. Presento diferencias en los porcentajes a los 4 minutos de inmersión entre los dos antibióticos, percibiendo el mayor porcentaje del 12.5 % con amoxicilina (T4) en comparación con bencilpenicilina que se observó el menor porcentaje del 4.2 %. Demostrando que fue una mejor combinación con bencilpenicilina que con el antibiótico amoxicilina.

- En la evaluación de oxidación de explantes, se observó que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión en la solución desinfectante la oxidación incrementa, por lo que a menor tiempo de inmersión menor oxidación, siendo de mucha importancia los resultados al momento de ver la viabilidad del explante vegetal. Presentaron ambos antimicrobianos su mayor porcentaje de oxidación con un 50 % a los 8 minutos de inmersión (T6) (T9), visualizándose que los tratamientos con amoxicilina su oxidación fue más severa generando un oscurecimiento y deterioro más rápido que con bencilpenicilina causando su muerte prematura del material vegetal, se presume que sus compuestos son más fuertes.
- En la evaluación de la viabilidad de los explantes, se presenciando un buen porcentaje de viabilidad a los 6 minutos de inmersión para ambos antibióticos, permitiendo su mayor porcentaje del 58.3 % con bencilpenicilina (T8) y con amoxicilina del 41.7 % (T5). Se observó que a medida que se aumenta el tiempo de inmersión en la solución desinfectante la viabilidad disminuye, por lo que a menor tiempo de inmersión mayor viabilidad.

Tabla 4: Efecto combinado del tiempo de inmersión en NaClO (3 %) con dos antibióticos.

Inmersión en NaClO (3 %) con antibióticos						
NaClO 3 %	Tratamientos	Tiempo de inmersión (min)	Bacterias	Hongos	Oxidación	Viabilidad
Con Amoxicilina	T4	4	33.3 %	12.5 %	16.7 %	37.5 %
	T5	6	20.8 %	8.3 %	29.2 %	41.7 %
	T6	8	16.7 %	4.2 %	50.0 %	29.2 %
Con Bencilpenicila	T7	4	25.0 %	4.2 %	25.0 %	45.8 %
	T8	6	8.3 %	8.3 %	25.0 %	58.3 %
	T9	8	4.2 %	4.2 %	50.0 %	41.7 %

Fuente propia

Hipoclorito de sodio al 3 % con antibióticos

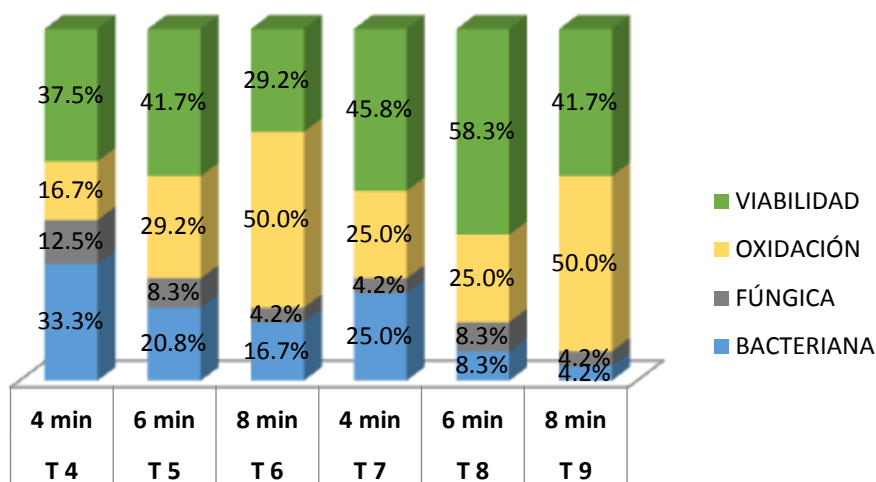


Figura 6: Porcentajes de inmersión en Hipoclorito de sodio (3%) con antibióticos en la desinfección de segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

En la tabla 4 se presenta los resultados del efecto combinado del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % más el antibiótico, siendo el método más adecuado de desinfección el T8, se diría que a mayor tiempo de exposición mayor sobrevivencia pero también interviene la variable de oxidación que afecta la supervivencia de los explantes, al evaluar esta variable se observó que a menor tiempo de exposición hubo menor oxidación que aumenta progresivamente de acuerdo con el tiempo de inmersión.

En la evaluación de la aplicación del antibiótico se demostró que la inmersión en Bencilpenicilina resultó ser más efectiva que el antibiótico amoxicilina, registrando que a los 6 minutos de inmersión (T8) hubo mayor viabilidad de explantes del 58.3 % presentando valores de contaminación microbiana del 8.3 % con un nivel de oxidación aceptable del 25 % en el establecimiento *in vitro* de explantes del *Vaccinium Corymbosum* (arándano). Otros trabajos también usaron antibióticos para disminuir la contaminación microbiana y tener mejores respuestas *in vitro* como en el trabajo de Vilma Jiménez y Ana Abdelnour (37) (38) que emplearon en su desinfección *in vitro* dos antibióticos de amplio espectro la estreptomicina y terramicina a bajas concentraciones para no ocasionar daños al explante, siendo un apoyo efectivo contra los patógenos existentes en el cultivo *in vitro*

de esta especie vegetal. En el trabajo de Jadán Guerrero M, Basantez K, etc. (8) emplearon brotes de yemas axilares evaluando también tres concentraciones de Hipoclorito de sodio (1, 1.5 y 2 %) durante dos tiempos (5 y 10 minutos) con el uso de Gentamicina 50 mg y Estreptomicina 25 mg en el medio de cultivo, alcanzaron buenos resultados con Hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 10 minutos y la inmersión en una solución de los dos antibióticos por 3 horas con un 68.5 %. Se suelen usar también mezclas de antibióticos en el medio de cultivo para eliminar la presencia de bacterias como en el estudio de Posada Pérez L, Gómez Kosky R, etc. (39) menciona que la inmersión en una mezcla de antibióticos redujo la contaminación bacteriana logrando un 62.8 % de eficacia. (8) (39)

En estos trabajos de investigación mencionan que los explantes tratados con antibióticos no mostraron síntomas de fitotoxicidad favoreciendo los porcentajes del establecimiento. Las concentraciones de los antibióticos sugeridas por autores deben ser bajas y adecuadas para disminuir los porcentajes de contaminación bacteriana en los explantes, empleando antibióticos de amplio espectro para tener un mayor rango de eficacia durante la desinfección, no siendo solo usadas en el cultivo *in vitro* sino también en el campo para el control de enfermedades generadas por bacterias. (8)

Tabla 5: Análisis de varianza ANOVA.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Contaminación Bacteriana	Entre grupos	4976,852	8	622,106	3,583	,012
	Dentro de grupos	3125,000	18	173,611		*
	Total	8101,852	26			
Contaminación Fúngica	Entre grupos	497,685	8	62,211	,977	,484
	Dentro de grupos	1145,833	18	63,657		NS
	Total	1643,519	26			
Oxidación de explantes	Entre grupos	5497,685	8	687,211	3,299	,017
	Dentro de grupos	3750,000	18	208,333		*
	Total	9247,685	26			
Viabilidad de explantes	Entre grupos	2291,667	8	286,458	1,650	,180
	Dentro de grupos	3125,000	18	173,611		NS
	Total	5416,667	26			

NS: No significativo.

*: Significativo.

Tabla 6: Resultados de los tratamientos de desinfección por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

Tratamientos de Desinfección											
NaClO 3 %	Tiempo de inmersión (min)	Tratamientos	Bacteria		Fúngica		Oxidación		Viabilidad		
			(%)	P	(%)	P	(%)	P	(%)	P	
Sin antibiótico	4	T1	50.0 ^a	36%	16.7 ^a	8%	8.3 ^b	19%	25.0 ^a	36%	
	6	T2	37.5 ^{ab}		4.2 ^a		12.5 ^{ab}		45.8 ^a		
	8	T3	20.8 ^{ab}		4.2 ^a		37.5 ^{ab}		37.5 ^a		
Con Amoxicilina	4	T4	33.3 ^{ab}	24%	12.5 ^a	8%	16.7 ^{ab}	32%	37.5 ^a	36%	
	6	T5	20.8 ^{ab}		8.3 ^a		29.2 ^{ab}		41.7 ^a		
	8	T6	16.7 ^{ab}		4.2 ^a		50.0 ^a		29.2 ^a		
Con Bencilpenicilina	4	T7	25.0 ^{ab}	13%	4.2 ^a	6%	25.0 ^{ab}	33%	45.8 ^a	49%	
	6	T8	8.3 ^b		8.3 ^a		25.0 ^{ab}		58.3 ^a		
	8	T9	4.2 ^b		4.2 ^a		50.0 ^a		41.7 ^a		

P: promedio del porcentaje y superíndices distintos dentro de cada columna denotan diferencia significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$), $n=27$.

La tabla 5 presenta el análisis estadístico ANOVA de la desinfección superficial de los segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), indicando que encontró diferencias estadísticas en dos de las cuatro variables analizadas, resultando las variables de contaminación bacteriana y oxidación de explantes estadísticamente diferentes con un cociente de varianza de $F: 3,583$ y un nivel de significancia del $P < 0.012$ para la contaminación bacteriana y para la oxidación de explantes un $F: 3,299$ y un $P < 0.017$. Existiendo evidencia estadística para confirmar que existe diferencia significativa y afirmando la no igualdad de medias entre los tratamientos de las soluciones desinfectantes. (Anexos I)

En la tabla 6 se puede observar que el mejor tiempo de inmersión para la desinfección de los segmentos nodales del *Vaccinium Corymbosum* (arándano) es de 6 minutos de inmersión, ya sea solo con Hipoclorito de sodio al 3 % o con la aplicación de antibióticos. Se generó en ese tiempo los mejores resultados de viabilidad con una menor oxidación y un bajo porcentaje de contaminantes microbianos en comparación de los otros dos tiempos de inmersión que causaron más daños de oxidación generando muerte y pérdida del material vegetal. Pero a mayor tiempo de exposición en Hipoclorito de sodio al 3 % más la inmersión del antibiótico, hubo mayores niveles de oxidación pero con niveles casi nulos de contaminación microbiana.

Contaminación Microbiana

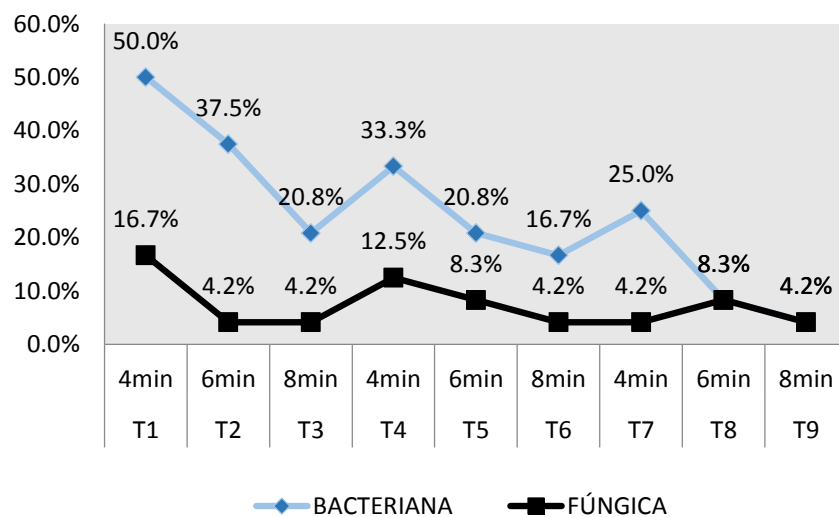


Figura 7: Porcentajes de contaminación microbiana en la desinfección por segmentos nodales del *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

Oxidación y viabilidad

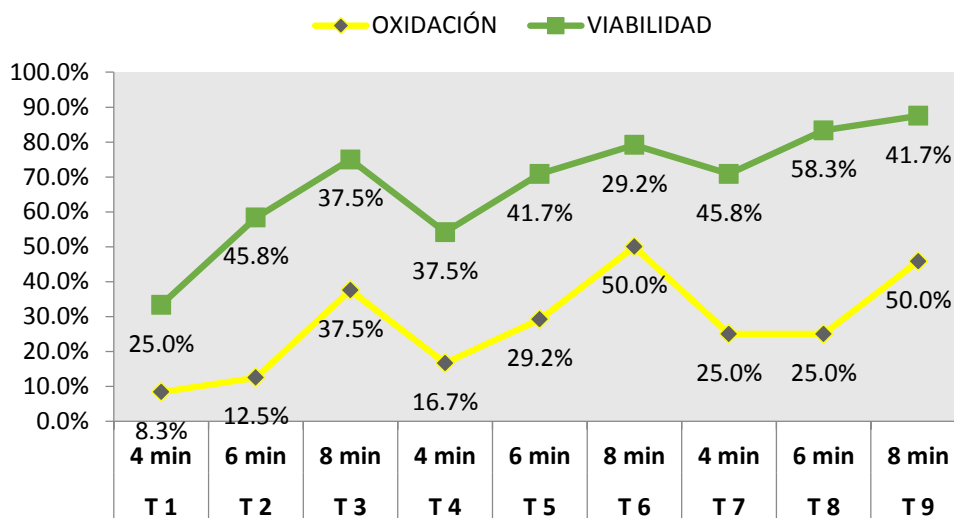


Figura 8: Porcentajes de oxidación y viabilidad en la desinfección por segmentos nodales del *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

La figura 8 de contaminación microbiana muestra las diferencias de porcentajes entre la contaminación por bacterias y por hongos, estos resultados estarían también relacionados con las características propias de las plantas donantes así como su microbiota propia, las cuales provienen de estaciones y regiones geográficas diferentes con tipos de suelos con condiciones agroclimáticas distintas. (9)

En la micropropagación de plantas leñosas los problemas más frecuentes son la contaminación microbiana como también la oxidación del explante y el *Vaccinium Corymbosum* (arándano) no está excepto de ella, como en la investigación del guayabo *in vitro* (10) que menciona en sus resultados que la contaminación microbiana como la fenolización puede causar limitaciones del establecimiento *in vitro*.

Se muestran en la figura 10 la oxidación de explantes, siendo uno de los problemas frecuentes en la micropropagación *in vitro*, se considera de suma importancia porque va de la mano con la sobrevivencia de los explantes pudiendo generar la muerte de ellos. En este

estudio se usó la solución antioxidante preparada con ácido ascórbico y ácido cítrico para combatir la oxidación durante la desinfección. En la descontaminación se suele utilizar los desinfectantes como el alcohol e Hipoclorito de sodio que aumentan los porcentajes de oxidación. Jadán Guerrero M, Basantez K, etc. (8) utilizaron Hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes de plantas leñosas y frutales generando bajos porcentajes de contaminación microbiana teniendo en cuenta la oxidación de explantes, alcanzaron buenos resultados con un 68.5 % de sobrevivencia. Vilma Jiménez y Ana Abdelnour (37) (38) uso enjuagues con antioxidantes (ácido ascórbico y cítrico) más la adición de carbón activado al medio de cultivo (500 mg/L), les fue efectivo para disminuir la oxidación también sugiere y menciona que el cloruro de mercurio en bajas concentraciones y periodos cortos de inmersión mostró ser más efectivo para la desinfección como para la disminución de la oxidación. Pero, el cloruro de mercurio es considerado como un desinfectante agresivo y dañino para el planeta por ello no se decidió su uso.

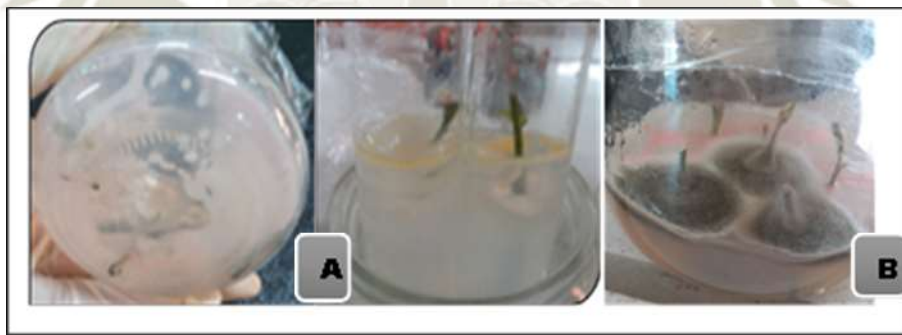


Figura 9: (A) contaminación bacteriana y (B) contaminación fúngica, crecimiento sobre el medio de cultivo (WPM) o alrededor de la base de los explantes de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

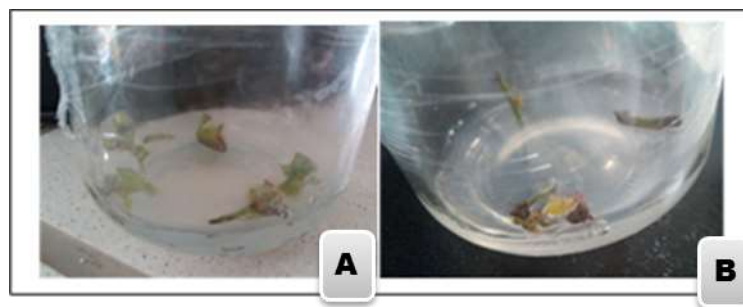


Figura 10: Oxidación de explantes (A) con Hipoclorito de sodio al 3% y (B) Hipoclorito de sodio al 3% más el antibiótico.



Figura 11: Explantes viables en la evaluación con Hipoclorito de sodio al 3 %.



Figura 12: Explantes viables en la evaluación con Hipoclorito de sodio al 3 % con antibióticos.

8. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANO:

8.1 Aislamiento:

En esta parte del estudio fueron seleccionados y separados los explantes que presentaron contaminación bacteriana en la fase de establecimiento *in vitro* del *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano), observándose la difusión del crecimiento progresivo de la bacteria a partir de los 14 días de ser sembrados los explantes en el medio de cultivo (WPM).

Las muestras recolectadas de los explantes con contaminación bacteriana, muestran una coloración entre blanquecina, amarilla o crema con una textura mucoide, creciendo generalmente en la superficie del cultivo y/o rodeando la base del explante.

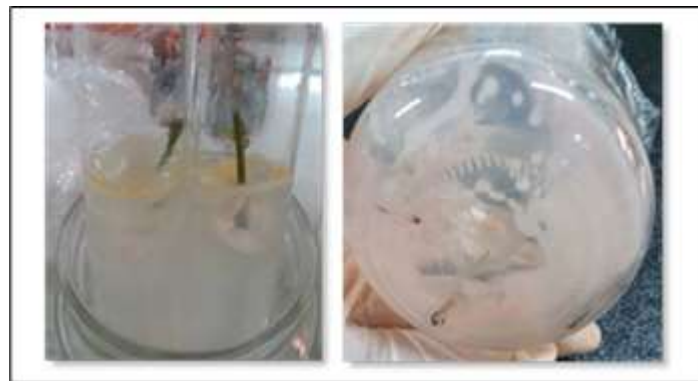


Figura 13: Segmentos nodales con presencia de contaminación bacteriana in vitro.

A partir de estas muestras se realizó el aislamiento y la purificación de la bacteria, se alcanzó el crecimiento bacteriano primario a las 48 horas de incubación en placas con medio Agar nutritivo (AN) a 37 °C, las colonias fueron subcultivados en medio Agar nutritivo hasta que se tuvo un cultivo puro, las placas del cultivo puro presentaron una difusión blanquecina observable a simple vista sobre el medio de cultivo Agar nutritivo.

Las colonias hasta la obtención del cultivo puro presentaron un crecimiento con una coloración variando entre blanquecino hasta un color amarillo como se exhiben en las figuras 18, 19 y 20, las características macroscópicas se detallan en la tabla 7.

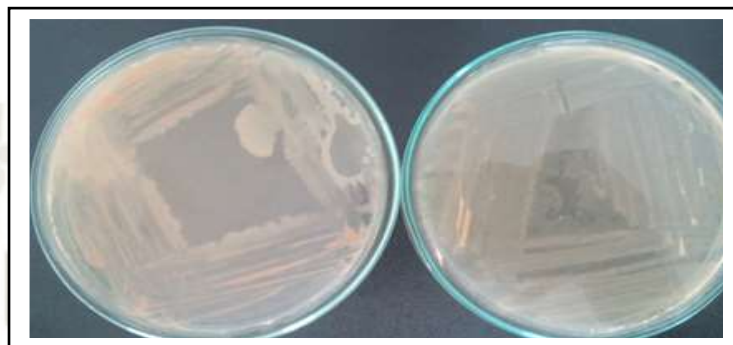


Figura 14: Cultivo primario en medio Agar nutritivo a las 48 horas de incubación.

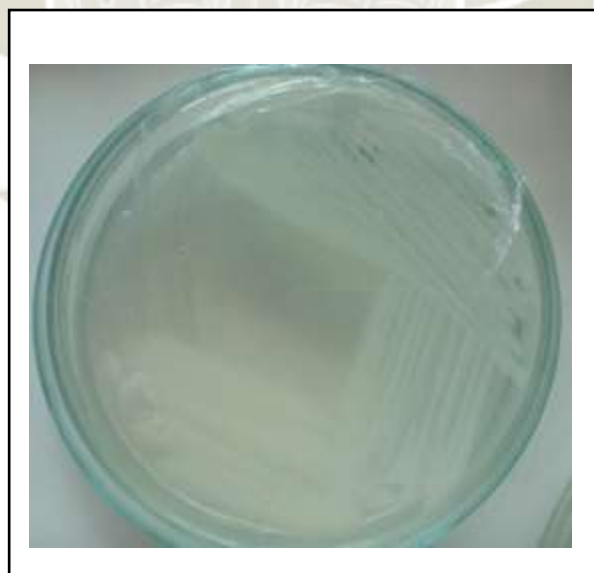


Figura 15: Aislamiento hasta la purificación de la bacteria (cultivo puro).

Tabla 7: Características del cultivo puro.

Características	Observaciones
Color colonias	beige
Forma	Irregular
Elevación	Plana con leve elevación
Borde	Ondulado- irregular
Textura	Mucoide
Color del medio	Conserva el color del medio

Fuente propia

8.2 Identificación del género microbiano:

Se realizó la identificación basada en características de las pruebas bioquímicas tomando en cuenta la caracterización morfológica, fisiológico y bioquímica, llevándose a cabo las observaciones de sus características macroscópicas y microscópicas para la identificación llegando hasta la categoría del género microbiano al cual pertenece. Los resultados fueron leídos visualmente después de haber concluido su tiempo de incubación y con las respuestas de las pruebas bioquímicas obtenidas se determinó el género microbiano al cual pertenece la bacteria en estudio acorde con los protocolos descritos en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) (20).

a. Características microscópicas:

Las tinciones realizadas aportaron una mejor visualización de la manera de agruparse, la estructura y el tamaño de célula, exhibiéndose así todas sus características estructurales de la bacteria en estudio. Las tinciones realizadas fueron la tinción de Gram, tinción de Wirtz-Conklin y la tinción Ziehl-Neelsen (BAAR) (figura 17).

Se visualizó al microscopio las características que presentó la bacteria pudiendo distinguir bacterias Gram positivas con forma de bacilos con presencia de endosporas de forma cilíndrica en la posición subterminal no deformante de la célula vegetativa, también la bacteria mostró no ser ácido alcohol resistente.

Para las observaciones se hizo mediante el uso de tinciones ya que gracias a la aplicación de sus colorantes como el cristal violeta, safranina, verde de malaquita y entre otros, ayudo a la visualización de la morfología de la bacteria gracias a la unión a la superficie celular de las bacterias.

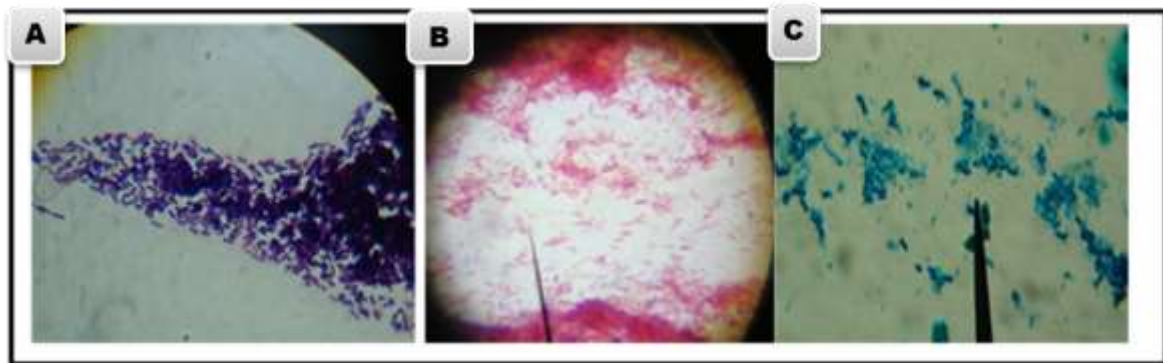


Figura 16: A. tinción de Gran, B. tinción Ziehl-Neelsen y C. tinción de Wirtz-Conklin (Schaeffer-Fulton).

Siendo un contaminante bacteriano de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano) que de acuerdo con las características microscópicas que presento el cultivo puro se pudo distinguir por las características morfológicas que presentan la bacteria, se podría presumir que pertenece al género *Clostridium* o *Bacillus*, pero ya que estas dos generan endosporas bajo condiciones ambientales desfavorables liberando la espora al exterior, pero la bacteria presento esporas no deformantes de la célula vegetativa de forma cilíndrica, dando como conclusión hasta esta etapa que la bacteria correspondería al género *Bacillus* basándonos por la posición y la morfología de la endospora esta bacteria presenta las características del género microbiano *Bacillus*

posiblemente perteneciente a la especie *Bacillus subtilis*, siendo este detalle un carácter taxonómico útil para diferenciar especies dentro de un mismo género. Las principales características mencionadas de este grupo son ser Gram positivo, forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas. (47)

b. Características macroscópicas:

Se realizó después las pruebas bioquímicas haciendo uso de reactivos químicos como también de medios de cultivos diferenciales y/o enriquecidos para identificar el género al que pertenece la bacteria en cuestión. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Prueba de Oxidasa, Prueba de Catalasa, Fermentación de carbohidratos, Prueba de oxidación/fermentación: (Hugh-Leifson(O/F)), Prueba de Urea, Prueba de Voges – Proskauer- (Caldo RM – VP), Prueba de Rojo de metilo, Prueba de Sulfuro, Indol, movilidad: Medio S.I.M., Prueba de Indol, Agar hierro y triple azúcar: T.S.I., Agar Citrato de Simmons, Agar de hierro lisina: Medio L.I.A., Agar TCBS, Agar Mueller–Hinton, Agar Manitol Salado, Agar MacConkey, Agar Dextrosa Sabouraud y Agar Salmonella-Shigella.

En algunas de estas pruebas las respuestas fueron rápidas e instantáneas tardando solo algunos minutos, mientras otras pruebas donde se usó medios de cultivo las respuestas tardaron entre 18-48 horas bajo incubación. Las pruebas bioquímicas del cultivo puro presentaron características específicas en los medios de cultivos diferenciales y enriquecidos dando un cambio de coloración después del tiempo de incubación proporcionando información certera e importante acerca de la fuente de contaminación bacteriana. (Anexo J)

Se identificó al contaminante más frecuente como resistente a los procesos de desinfección, tomando en cuenta todas las características de los resultados mostrados por la bacteria aislada de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano), se llegó a la conclusión del género microbiano haciendo uso del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) (20), que el contaminante bacteriano pertenecería al género *Bacillus* mostrando los resultados el predominio de este contaminante bacteriano. Tabla 8

Se muestra el mismo resultado en el trabajo del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) (48) que identificaron como contaminante al género *Bacillus* y *Pseudomona* y en el trabajo de la Ing. Agr. Laura Pérez (49) en su identificación de los microorganismos del cultivo *in vitro* de yerba mate, identificó 20 géneros de bacterias entre ellos el *Bacillus* y menciona que la mayoría de los contaminantes en cultivo *in vitro* son microorganismos endofíticos. Portal González N, Carballoso I, Alvarado Capó (10) menciona que los autores Ramírez y Salazar (1997) evaluaron el Hipoclorito de sodio en el establecimiento de segmentos nodales de guayabo cultivados *in vitro*, obtuvieron en la totalidad de los tratamientos alta contaminación bacteriana la que correspondió a la bacteria Gram positiva. Alvarado-Capó (48) identificó al *Bacillus pumilus* como contaminante y sus resultados coincidieron con la referencia de autores que indican que los explantes murieron debido a la contaminación por bacterias, ellos mencionan al género *Bacillus* junto a otros como los principales contaminantes pudiendo encontrarse una gran variedad de géneros y especies siendo relacionados con afectar el crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales.

El género *Bacillus* demostró ser el contaminante resistente a los métodos de desinfección del establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), su resistencia estaría relacionada con la capacidad que posee de adaptarse a condiciones medioambientales extremas formando endosporas siendo viables en el ambiente por períodos largos de tiempo y goza de habilidades fisiológicas, acidofílicos a alcalinofílicos, psicrófilos a termófilos que les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, desecación, pH y entre otros (47) (48). Similares resultados fueron descritos por el trabajo del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) (48) que desinfectaron en Hipoclorito de sodio al 3 % bajo condiciones asépticas y aun así el género *Bacillus* se encontró como contaminante recurrente, ellos mencionan también que otros autores sometieron los explantes de caña de azúcar a termoterapia y a diferentes desinfectantes, pero al final el género *Bacillus* continuó siendo uno de los contaminantes más comunes de la fase de establecimiento *in vitro* (48).

Tabla 8: Tabla resumen de la interpretación de los resultados en la identificación del género microbiano.

Características Morfológicas			
Bacteria	Tinción Gran	Forma	Esporas
<i>Bacillus spp.</i>	Gram positivo	bacilos	Cilíndrica- subterminal

Fuente propia.

Las bacterias ocupan un gran lugar dentro de los microorganismos contaminantes, algunos de ellos pueden crecer en los medios de cultivo y/o alrededor de la base de los explantes aun después de la aplicación de métodos de saneamiento o de desinfección a los cuales son expuestos el material vegetal. (9)

La fase de establecimiento *in vitro* se ve afectada normalmente por contaminantes bacterianos ya que serían capaces de colonizar internamente el tejido de plantas sanas, identificando los contaminantes más representativos de esta etapa serían los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Pseudomonas* gracias a la presencia de ellos en los medios de cultivo el material vegetal es expuesto a procesos de desinfección superficial. (48)

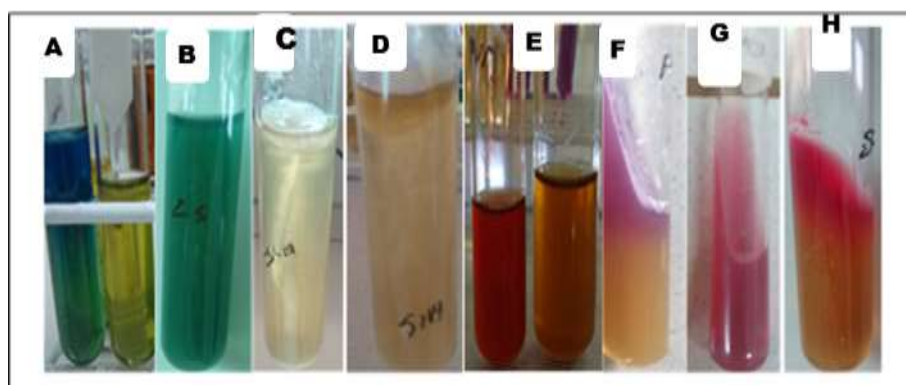


Figura 17: Pruebas bioquímicas: A) oxidación/fermentación:(Hugh-Leifson(O/F)), B) Agar Citrato de Simmons, C) Prueba de Sulfuro, Indol, movilidad: Medio S.I.M., D) Prueba de Indol, E) Prueba de Rojo de metilo- Prueba de Voges – Proskauer (Caldo RM – VP), F) Agar de hierro lisina: Medio L.I.A., G) Prueba de Urea, H) Agar hierro y triple azúcar: T.S.I.

9. ANTIBIOGRAMA: Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana.

Se realizó el antibiograma mediante el método de disco-placa siguiendo el protocolo de la técnica de Kirby-Bauer descrito anteriormente. El método consistió en identificar la sensibilidad antimicrobiana del contaminante bacteriano resistente a los métodos de desinfección, aislada del medio de cultivo de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano). (32)

En la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana se empleó discos de sensibilidad comercial de las marcas Biodisc Sac, Oxoid-UK y BBL. Se ensayó con los antimicrobianos probados rutinariamente como: Amoxicilina/Ac. Clavulánico: (AMC), Rifampicina (RA), Ampicilina: (AM), Tetraciclina (TE), Penicilina G: (P), Kanamicina (K), Cloranfenicol (C), Vancomicina (VA), Amikacina (MK), Oxacilina (OX), lincomicina (L), Azitromicina (AZT) y Cefalosporinas (Ceftriaxona (CRO) y Cefotaxima (CTX)) (tabla 9). Los discos de sensibilidad fueron colocados bajo estrictas condiciones de esterilidad sobre la superficie de las placas de Agar Mueller-Hinton, se distribuyó de cinco a seis discos de sensibilidad por placa manteniendo una adecuada distancia entre ellos. (36) (33)

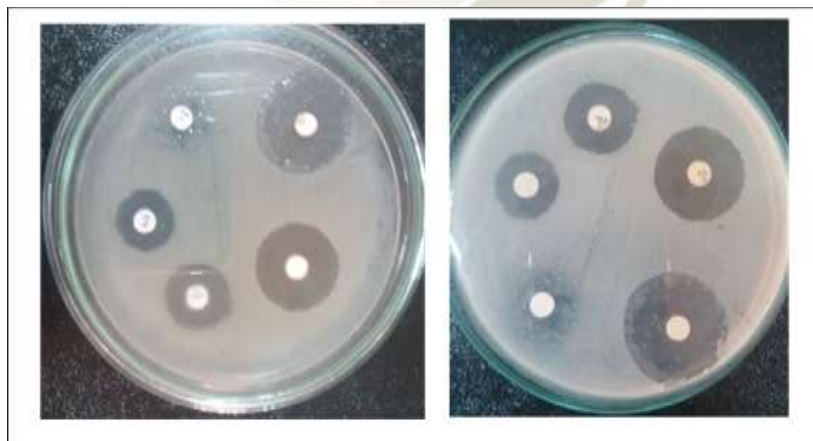


Figura 18: Antibiograma frente a la cepa bacteriana.

Se incubó las placas por 24 horas a 37 °C y los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana exhibieron los halos de inhibición característicos formados en relación con la bacteria aislada e identificada con la presencia de diferentes antibióticos ensayados. La interpretación de los resultados fue determinado como resistente (R), intermedio (I) o sensible (S) de acuerdo con el The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST versión 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>). (50) (51) (52)

Los resultados del antibiograma realizados a la bacteria *Bacillus spp.* aislada e identificada de los explantes de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano), en la interpretación de los resultados la bacteria mostró ser sensible a la Tetraciclina (30 ug), kanamicina (30 ug), Cloranfenicol (30 ug), Vancomicina (30 ug), Amikacina (30 ug) y los antibióticos que presentaron una sensibilidad intermedia son Amoxicilina/Ac. Clavulánico (30 ug), Rifampicina (5 ug), pero los antibióticos que mostraron ser resistentes fueron Penicilina (10 u), Ampicilina (10 ug), Oxacilina (1 ug), Ceftriaxona (30 ug), Lincomicina (2 ug), Azitromicina (15 ug) y Cefotaxima (30 ug). Ver tabla 9 y (Anexo K)

El antibiograma bajo el método de difusión en Agar, en la lectura de los resultados la bacteria presentó un diámetro de halo considerable de inhibición para Tetraciclina (30 ug), Amoxicilina/ácido clavulánico (30 ug), kanamicina (30 ug), Cloranfenicol (30 ug), Amikacina (30 ug) y Rifampicina (5 ug), manifestando eficacia en el control del contaminante bacteriano (*Bacillus spp.*), pudiendo ser considerados para el control de esta bacteria en el establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (Arándano). Similares resultados fueron alcanzados por Cruz-Martín M, García-Ramírez Y, etc. (53) en su prueba de susceptibilidad de sus cuatro antibióticos ensayados siendo el Sulfato de Gentamicina el más efectivo con un mayor halo de inhibición a una menor concentración, así como en el trabajo de Héctor E, Barrón ML, Godoy L, etc. (54) en su estudio de sensibilidad.

Tabla 9: Interpretación de la prueba de sensibilidad Antimicrobiana.

Discos de sensibilidad	Concentración	Interpretación
Penicilina (P)	10 u	R
Tetraciclina (TE)	30 ug	S
Amoxicilina /ácido clavulanico (AMC)	30 ug	I
Rifampicina (RA)	5 ug	I
Ampicilina (AM)	10 ug	R
kanamicina (K)	30 ug	S
Cloranfenicol (C)	30 ug	S
vancomicina (VA)	30 ug	S
Amikacina (MK)	30 ug	S
Oxacilina (OX)	1 ug	R
Lincomicina (L)	2 ug	R
Azitromicina (AZT)	15 ug	R
Ceftriaxona (CRO)	30 ug	R
Cefotaxima (CTX)	30 ug	R

Fuente propia. Resistente (R), Intermedio (I) o sensible (S).

CONCLUSIONES

Con los estudios realizados en este trabajo de investigación se puede concluir:

Primero. Se pudo atender la necesidad de una satisfactoria descontaminación del establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), siendo capaz de controlar y prevenir los contaminantes microbianos con la inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 %. En la evaluación de los explantes bajo los tres tiempos de inmersión (4, 6 y 8 minutos), se logró el mejor resultado a los 6 minutos de exposición con valores de contaminación bacteriana y fúngica del 37.5 % y del 4.2 % con una oxidación del 12.5 % y ofreciendo una buena viabilidad del 45.8 % (T2).

Segundo. Se pudo atender la necesidad del problema de una satisfactoria descontaminación del establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano), siendo capaz de controlar y prevenir el contaminantes microbianos en la inmersión con NaClO (3 %) más la aplicación de antibióticos. En la evaluación de los explantes en el efecto combinado del tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio al 3 % más el antibiótico, el mejor resultado se obtuvo a los 6 minutos de inmersión con Bencilpenicilina (T8), presentando valores de contaminación microbiana del 8.3 % con un nivel de oxidación aceptable del 25 % y ofreciendo la mayor viabilidad de explantes del 58.3 %. Se visualizó que con la presencia de antibióticos disminuyó significativamente los porcentajes de proliferación de bacterias con respecto a solo inmersión en Hipoclorito de sodio (3 %).

De los dos antibióticos o antimicrobianos examinados (amoxicilina y bencilpenicilina), la inmersión en Bencilpenicilina resultó ser más efectiva que la inmersión en Amoxicilina en la desinfección por segmentos nodales de *Vaccinium Corymbosum* (arándano).

Tercero. Se identificó que el contaminante más frecuente como resistente a los tratamientos de desinfección del establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* (arándano) fue el género *Bacillus*, observándose su presencia en la base de los explantes y/o sobre el medio de cultivo *in vitro* y las características que presentó la bacteria fue ser Gram positivas de forma de bacilos con presencia de endoesporas cilíndrica en la posición subterminal no deformante de la célula vegetativa, estas características son propias de este género.

Cuarto. En el Antibiograma bajo el método de difusión en Agar, los resultados de la interpretación de los antibióticos o antimicrobianos que mostraron sensibilidad fueron: Tetraciclina (30 ug), kanamicina (30 ug), Cloranfenicol (30 ug), Vancomicina (30 ug), Amikacina (30 ug) y los antibióticos que presentaron una sensibilidad intermedia son Amoxicilina/Ac. Clavulánico (30 ug), Rifampicina (5 ug), pero los antibióticos que mostraron ser resistentes fueron Penicilina (10 u), Ampicilina (10 ug), Oxacilina (1 ug), Ceftriaxona (30 ug), Lincomicina (2 ug), Azitromicina (15 ug) y Cefotaxima (30 ug) frente a la bacteria *Bacillus spp.* aislada e identificada de los explantes de la fase de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (arándano).

Se presenció un halo considerable de inhibición durante la lectura de los resultados para la Tetraciclina (30 ug), Amoxicilina/ácido clavulánico (30 ug), kanamicina (30 ug), Cloranfenicol (30 ug), Amikacina (30 ug) y Rifampicina (5 ug), manifestando así una eficacia en el control del contaminante bacteriano (*Bacillus spp.*), pudiendo ser considerados para el control de esta bacteria en el establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum L.* (Arándano).

RECOMENDACIONES

Estas recomendaciones van dirigidas para los investigadores y las investigaciones futuras relacionadas con este trabajo.

Decidir el agente desinfectante más efectivo teniendo en cuenta las concentraciones y el tiempo de exposición más adecuados para el material vegetal *in vitro*.

Se recomienda utilizar material vegetal joven y que las plantas madres sean procedentes de invernaderos que cumplan con los cuidados fitosanitarios.

Se aconseja realizar más investigaciones haciendo uso de antibióticos como complemento en la desinfección de los explantes *in vitro*.

Se aconseja también realizar más investigaciones de aislamiento de los microorganismos que afectan a los explantes *in vitro*, para contar con un plan de respaldo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Rosa L da, Etcheverria C, ... E da SD-R. EFEITO DE ANTIBIÓTICO E DO PERÍODO DE ESCURO NO ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MIRTILO *Vaccinium* spp. *RevistaseletronicasPucrsBr* [Internet]. Available from: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/6223/0>
2. Bonilla V, Marcha AE-T en, 2016 undefined. Establecimiento in vitro de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. dialnet.unirioja.es.
3. Alvarado-Capó Y, ... MC-M-B, 2003 undefined. Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. *revista.ibp.co.cu*.
4. Ramírez LA, Castaño SM, López R. Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth Identification of bacteria affecting in vitro establishment of nodal segments of *Guadua angustifolia* Kunth. *Rev Investig Univ del Quindío*. 2009;(19):151–8.
5. Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, ... AD-RC, 2004 U. Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2004;35(3):155–61.
6. Gómez AH, Esquivel AA. Establecimiento In Vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). 2013;26(4):64–71.
7. Alvarado-Capó Y, ... NG-B, 2006 undefined. Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de *Pantoea agglomerans*, contaminante de la multiplicación in vitro de *Solanum tuberosum* L cv. *Desirée*. *revista.ibp.co.cu*.
8. Jadán Guerrero M, Basantez K, Gómez Kosky R, Bermúdez Carballoso I. Establecimiento in vitro de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnol Veg*. 2016;16(2):67–72.
9. Alvarado Capó Y, Portal González N, García Aguila L, Ramírez D, Martínez Y. Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnol Veg* [Internet]. 2003;3(1):31–6. Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/204/180>
10. Portal González N, Carballoso I, Alvarado Capó Y, Leiva Mora M. Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento in vitro del guayabo. *Rev Biotecnol Veg*. 2003;3(2):169–72.

11. Monteval A. GUÍA DE CULTIVO ORIENTACIONES PARA EL CULTIVO DEL ARÁNDANO Proyecto de cooperación "Nuevos Horizontes" GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO [Internet]. [cited 2019 Mar 9]. Available from: http://www.naviaporcia.com/images/documentos/documento_173.pdf
12. Romero C. El arandano en el Perú y el mundo. Dir Gen POLÍTICAS Agrar [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 9];1–42. Available from: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/el_arandano.pdf
13. Gobierno de Cantabria. Consejería de Desarrollo Rural, Ganadería P y B. Los frutos del bosque o pequeños frutos en la cornisa cantábrica: El Arándano [Internet]. Gobierno d. 2010 [cited 2019 Apr 19]. 160 p. Available from: https://frutales.files.wordpress.com/2011/05/2011_arandano.pdf
14. Gordó M. Guía práctica para el cultivo de Arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires. Inta [Internet]. 2011 [cited 2019 Mar 9];15. Available from: www.inta.gov.ar/sanpedro
15. Undurraga P, Vargas S. Manual de Arandano. Inst Investig Agropecu [Internet]. 2013 Aug [cited 2019 Apr 19];120. Available from: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf>
16. Morales C. Manual de manejo agronómico del arándano- BOLETÍN INIA / N° 06 [Internet]. Santiago de Chile; 2017 [cited 2019 Apr 20]. Available from: http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/06_Manual_Arandanos.pdf
17. Echenique V, Rubinstein C, Hopp Luis Mroginski Gabriela Levitus E. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA ARGENBIO- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología [Internet]. [cited 2019 Mar 31]. Available from: www.argenbio.org
18. Sharry SE, Adema M, Abedini W. Plantas de probeta. 2015;240. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
19. Roca WM, Mroginski LA. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical; 1991. 969 p.
20. BREED RS, MURRAY EGD, SMITH NR. Bergey's Manual of Determinative

- Bacteriology [Internet]. 7th ed. Vol. 7, the Williams & Wilkins Company. U.S.A: the Williams & Wilkins Company; 1957 [cited 2020 May 1]. 1130 p. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848>
21. Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco MM, Zuazo Silva JL. Microbiología y Parasitología Médicas. tomo 1. La Habana; 2001. 550 p.
 22. Frioni L. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. In: Estudios filológicos. 2005. p. 466.
 23. Lopardo HA. Introducción a la microbiología clínica FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Libros de Cátedra [Internet]. 2016. 358 p. Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52389/Documento_completo.pdf?sequence=1
 24. López-Hontangas JL, Castillo FJ, Salavert M. Capítulo 3: Técnicas de identificación. Microbiol Apl al Paciente Crítico [Internet]. 2007;27–41. Available from: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>
 25. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 22];29(8):601–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X11001571>
 26. Gobernado M, López-Hontangas JL. Identificación bacteriana. Serv Microbiol Hosp La Fe Val España. 2003;21(2):54–60.
 27. López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investig en Discapac [Internet]. 2014;3(1):10–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48632>
 28. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In: Temas de Bacterología y Virología Médica [Internet]. 2006 [cited 2019 May 1]. p. 663–71. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/bacvir/materiales/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
 29. Sacsquispe Contreras R, Velásquez Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. Lima; 2002. 68 p.
 30. Lopardo HA. Introducción a la microbiología clínica. Argentina: Universidad Nacional de La Plata, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Libros de Cátedra;

2016. 358 p.
31. Luis DSAM de B. MANUAL DE ACTUALIZACION EN RESISTENCIA BACTERIANA Y NORMAS CLSI M100 – S20 2010. Grup PARA EL Control LA Resist Bact BOGOTÁ-GREBO-SECRETARIA Dist SALUD [Internet]. 2010 [cited 2019 May 1];78:6-67. Available from: http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf
 32. Bernal R. M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. Biomédica [Internet]. 1984 Dec 1 [cited 2019 Mar 6];4(3-4):112. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
 33. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos Método de difusión con discos. Eur Comm Antimicrob Susceptibility Test -European Soc Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2014 [cited 2019 May 1];4:18. Available from: www.eucast.org
 34. Becton Dickinson and Company. Patron de turbidez BBL preparado [Internet]. U.S.A; 2005 [cited 2020 May 1]. Available from: http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf
 35. Sanz Cervera SA. Prácticas de Microbiología. 2º edición. Universidad de Rioja; 2011. 102 p.
 36. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing-Reading guide. EUCAST-European Soc Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2019 [cited 2019 May 2];6:26. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf
 37. Jiménez Bonilla V, Abdelnour Esquivel A. In vitro establishment of *Vaccinium consanguineum*, a native blueberry from Costa Rica. Revista Tecnología en Marcha. 2016;29(2):77–84.
 38. Jiménez Bonilla V, Abdelnour Esquivel A. Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguinium*). Rev Tecnol en Marcha. 2018;31(1):144–59.
 39. Posada Pérez L, Gómez Kosky R, Gallardo Colina J, Reyes Vega M, Herrera Ofarril I. Establecimiento in vitro de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de

- Papaya IBP 42-99. *Biotechnol Veg.* 2004;4(3):153–8.
40. Arruda AL, Camargo S, Richter AF, Grimaldi F, Paiano GM, Santos da Silva, P, et al. Position of explants during in vitro multiplication of blueberry cv. O'neal. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa- congrega.* 2017;14(14):2265–72.
41. Rache Cardenal LY, Pacheco Maldonado JC. Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Act Bot Bras.* 2010;24(4):1086–95.
42. Calisaya Azpilcueta DA, Espinoza villegas GE. Desarrollo de un protocolo para el establecimiento y multiplicación in vitro de *Vaccinium corymbosum* L.(arándano de arbusto alto) variedad Misty, a partir de segmentos nodales en un Reactor de Inmersión Temporal. UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA; 2014.
43. Fan S, Jian D, Wei X, Chen J, Beeson RC, Zhou Z, et al. Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through in vitro shoot culture. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2017;226:277–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.052>
44. Borges García M, Ros Araluce C, Castellanos Rubio Y, Milanes Rodríguez S, Velásquez Fera R. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotechnol Veg.* 2004;4(4):237–42.
45. Niubó E, Díaz P, Olivia O, Portieles R, Díaz A, Ancheta O, et al. Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2004;35(3):155–61.
46. Brenes Angulo A, Castillo Matamoros R, Gómez alpízar L. Micropropagación de cuatro cultivares de arándanos (*Vaccinium* spp .) a partir de segmentos nodales de dos procedencias. *Agron Costarric.* 2015;39(1):7–23.
47. Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM, Heydrich-Pérez M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Rev CENIC Ciencias Biol* [Internet]. 2011;42(3):131–8. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
48. Alvarado-Capó Y. Incidencia , identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum* spp . híbrido) [Internet]. UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS-Cuba; 2003. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Yelenys_Alvarado-

- Capo/publication/277132233_Incidencia_identificacion_y_estrategias_para_la_preencion_y_el_control_de_contaminantes_bacterianos_en_el_cultivo_in_vitro_de_la_cana_de_azucar_Saccharum_spp_hibrido_Tesis_p
49. Ing. Agr.LAURA PÉREZ M. Caracterización de microorganismos contaminantes en sistemas de micropropagación de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) [Internet]. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Botánica del Nordeste.; 2016 [cited 2019 Apr 8]. Available from: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/458>
 50. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Eur Comm Antimicrob Susceptibility Test EUCAST [Internet]. 2019 [cited 2019 May 4];9:100. Available from: <http://www.eucast.org>.
 51. Cantón R. Interpretive reading of the antibiogram: A clinical necessity. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010 [cited 2019 May 13];28(6):375–85. Available from: http://www.eucast.org/mic_distribution-
 52. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 2];20(4):255–66. Available from: <http://www.eucast.org>
 53. Cruz-Martín M, García-Ramírez Y, Sánchez-García C, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Roque B, et al. Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnol Veg*. 2007;7(1):9–13.
 54. Héctor E, Barrón ML, Godoy L, Díaz B, Hernández MM, Torres A. Un método para la desinfección y el establecimiento in vitro de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). *Cultiv Trop Nac Ciencias Agrícolas Cuba*. 2005;26(1):69–71.
 55. HiMedia Laboratories. Woody Plant Medium. Plantigen Himedia [Internet]. 2017;2. Available from: <http://www.himedialabs.com/TD/PT026.pdf>

ANEXOS



Anexo A: Plantas madre de Arándano de la variedad biloxi.



Anexo B: Solución desinfectante.



Anexo C: Siembra del material vegetal en el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM).



Anexo D: Preparación de medios de cultivo diferenciales y/o enriquecidos.



Anexo E: Reactivos empleados en la identificación bacteriana.



Anexo F: Suspensión bacteriana equivalentes al tubo N° 0.5 de la escala de McFarland.



Anexo G: Discos de sensibilidad comercial de las marcas Biodisc Sac, Oxoid-UK y BBL.

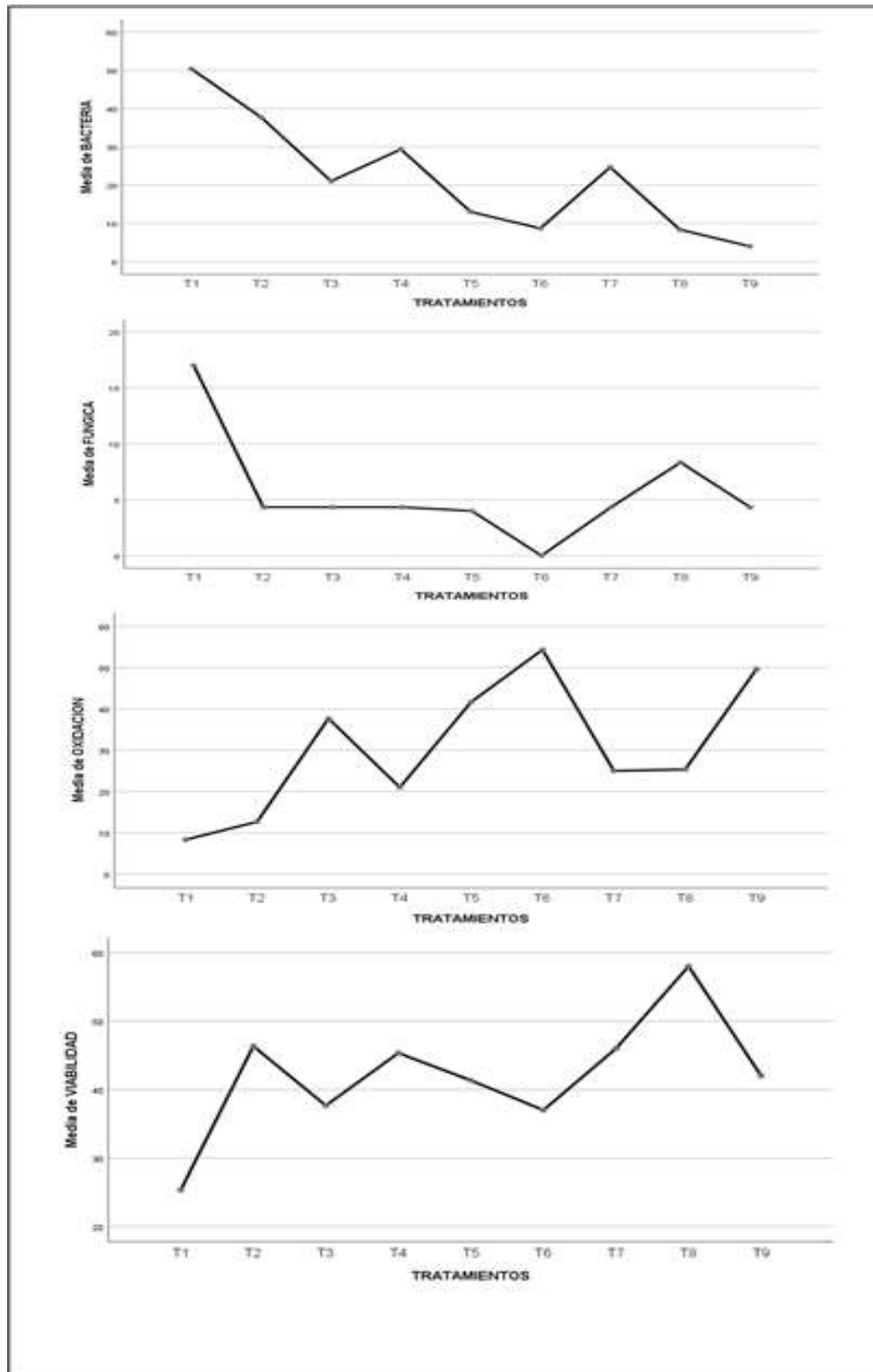
Anexo H : Composición química del Medio Woody Plant (WPM).

Composición	Fórmula	Concentración mg/L
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	400.000
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	72.500
Nitrato de calcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	386.340
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	180.690
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	170.000
Sulfato de potasio	K_2SO_4	990.000
Micronutrientes		
Ácido bórico	H_3BO_3	6.200
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
sal EDTA disodio- dihidrato	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.300
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
Sulfato de manganeso monohidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.300
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.213
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
Vitaminas		
Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	2.0
Mio-inositol	-	100.000
Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_2$	0.500
Piridoxina.HCl	-	0.500
Tiamina. HCl	-	1.000
Aminoácido		
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2.000

Composición originaria de Lloyd and McCown de 1981.

Composición modificada fuente: HiMedia Laboratories. Woody Plant Medium (55).

Anexo I: Gráfico de medias de las variables de contaminación bacteriana, contaminación fúngica, oxidación y de viabilidad de explantes.



Fuente propia.

Anexo J: Resultados de las pruebas bioquímicas del contaminante bacteriano del establecimiento *in vitro* de *Vaccinium Corymbosum* L. (arándano).

Características	<i>Bacillus</i>
Color de la colonia en AN	Beige blanca
Morfología	Bacilos, Gran +
Motilidad	+ -
Espora	Forma Esférica Posición Central
Catalasa	+
Oxidasa	-
Prueba de Hugh y Leifson (O/F):	
oxidativo	-
fermentativo	+
Medio S.I.M.:	
prueba de Sulfuro	-
prueba de Indol	-
prueba de motilidad	+ -
Agar Urea	+
Agar Citrato de Simmons	-
Agar hierro y triple azúcar: T.S.I.:	K/A- -
Asimilación de glucosa	+
Asimilación de lactosa	-
Asimilación de sacarosa	-
producción de gas	-
producción de H ₂ S	-
Caldo RM – VP:	
prueba de Rojo de Metilo	+
prueba de Voges Proskauer	-
Agar Manitol Salado	-
Asimilación de manitol	-
Agar MacConkey	-
Agar Salmonella-Shigella	-
Agar TCBS	-
Agar Mueller–Hinton	+
Agar hierro lisina: Medio L.I.A.	
Descarboxilación de la lisina	-
Desaminación de la lisina	-
Producción de gas	+

Fuente propia. (+): Positivo, (-): negativo, (+ -): intermedio.

Anexo K: Medición de los halos de inhibición en la prueba de sensibilidad.

Discos de sensibilidad	Concentración	Halo de inhibición (mm)
Penicilina G (P)	10 u	15
Tetraciclina (TE)	30 ug	22
Amoxicilina /ácido clavulanico (AMC)	30 ug	17
Rifampicina (RA)	5 ug	17
Ampicilina (AM)	10 ug	13
kanamicina (K)	30 ug	18
Cloranfenicol (C)	30 ug	21
vancomicina (VA)	30 ug	15
Amikacina (MK)	30 ug	19
Oxacilina (OX)	1 ug	10
Lincomicina (L)	2 ug	-
Azitromicina (AZT)	15 ug	-
Ceftriaxona (CRO)	30 ug	16
Cefotaxima (CTX)	30 ug	10

Fuente propia.